

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-236951

(43)Date of publication of application : 17.09.1993

(51)Int.Cl.

C12N 5/08
C08B 37/08
// A61K 35/407

(21)Application number : 03-244152

(71)Applicant : SEIKAGAKU KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 30.08.1991

(72)Inventor : YADA TOSHIKAZU
KOIDE NORIO
KIMATA HIROHARU**(54) SPHERICALLY AGGLOMERATIVE AGENT FOR HEPATOCYTE AND METHOD OF CULTURE****(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain the subject agent capable of efficiently giving, stably over a long period, substantial hepatocyte agglomerates playing a role as an auxiliary for artificial liver function by binding of glycosaminoglycan to a lipid through covalent bond.

CONSTITUTION: The objective agglomerative agent can be obtained by binding (A) the carboxyl (including lactone), formyl, or primary amino group of a glycosaminoglycan pref. with its reduced terminal cleaved, or such group of a spacer introduced thereinto, to (B) the primary amino, carboxyl, or formyl group of a lipid, through covalent bond (e.g. CONH, ester, CH₂NH linkage).

Said lipid is pref. phosphatidylethanolamine; and the glycosaminoglycan is pref. chondroitinsulfuric acid C with its reduced terminal cleaved.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 28.08.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3199405

[Date of registration] 15.06.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 5 - 2 3 6 9 5 1

(43) 公開日 平成 5 年 (1993) 9 月 17 日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 5/08				
C08B 37/08		Z 7433-4C		
// A61K 35/407		7431-4C		
		7236-4B	C12N 5/00	E

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全 46 頁)

(21) 出願番号	特願平 3 - 2 4 4 1 5 2	(71) 出願人	0 0 0 1 9 5 5 2 4 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町 2 丁目 1 番 5 号
(22) 出願日	平成 3 年 (1991) 8 月 30 日	(72) 発明者	矢田 俊量 愛知県名古屋市守山区白山 2 丁目 9 0 1 番 地 マンション セラヴィ S 棟 3 0 1 号
		(72) 発明者	小出 典男 岡山県岡山市南方 3 丁目 8 番 1 7 号
		(72) 発明者	木全 弘治 愛知県名古屋市天白区植田山 1 丁目 1 4 0 4 番地
		(74) 代理人	弁理士 津国 肇 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 肝細胞球状集塊化剤及び培養法

(57) 【要約】

【構成】 脂質が共有結合したグリコサミノグリカンを培養基質とする培養容器で肝実質細胞を培養することにより、球状集塊化した肝細胞を形成させることができる。

【効果】 肝特異的機能を維持し、長期間安定に集塊化し、浮遊した肝細胞球状集塊化物を効率的に得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 脂質が共有結合したグリコサミノグリカンを含む肝細胞球状集塊化剤。

【請求項 2】 該グリコサミノグリカンが、還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンである請求項 1 の肝細胞球状集塊化剤。

【請求項 3】 脂質が共有結合したグリコサミノグリカンが、還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンのカルボキシル基（ラクトンを含む）、ホルミル基もしくは 1 級アミノ基、または導入されたスペーサーの前記基で脂質と結合している請求項 2 の肝細胞球状集塊化剤。

【請求項 4】 脂質が共有結合したグリコサミノグリカンが、脂質の 1 級アミノ基、カルボキシル基もしくはホルミル基、または導入されたスペーサーの前記基で還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンと結合している請求項 2 の肝細胞球状集塊化剤。

【請求項 5】 脂質とグリコサミノグリカンとの共有結合が、

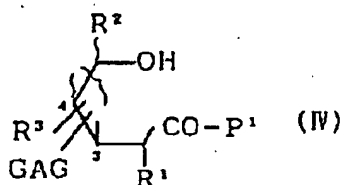
① 還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンのカルボキシル基と、脂質の 1 級アミノ基とから形成された C ONH 結合、

② グリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシル基と、脂質の 1 級アミノ基とから形成された C ONH 結合、または

③ 還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンのホルミル基と、脂質の 1 級アミノ基とから形成された CH₂ NH 結合である請求項 1 の肝細胞球状集塊化剤。

【請求項 6】 脂質結合グリコサミノグリカンが、一般式

【化 1】



【上記式中、P¹ は 1 級アミノ基を有する脂質を示し、GAG は開裂された還元末端部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、

(1) GAG がヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸 A、C もしくは E、デルマトン硫酸、ヘパリン、又はヘパリン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマトン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、R¹ は 3 位に置換し、R¹ は OH 基を示し、R¹ は COOH 基を示し、R¹ は OH 基を示す。

(2) GAG がコンドロイチン硫酸 D から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはヘパリン又はヘパリン硫酸から還元性末端

のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、R¹ は 3 位に置換し、R¹ は OSO₃H 基を示し、R¹ は COOH 基を示し、R¹ は OH 基を示す。

(3) GAG がコンドロイチン硫酸 K から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、R¹ は 3 位に置換し、R¹ は OH 基を示し、R¹ は COOH 基を示し、R¹ は OSO₃H 基を示す。

(4) GAG がコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 4 位に、R¹ は 3 位に置換し、R¹ および R² の少なくとも一つは OSO₃H 基を示し、他は OH 基を示し、R¹ は COOH 基を示す。

(5) GAG がケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、R¹ は 4 位に置換し、R¹ 及び R² は OH 基を示し、R¹ は CH₂ OH 基を示す。

(6) GAG がケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、R¹ は 4 位に置換し、R¹ 及び R² は OH 基を示し、R¹ は CH₂ OSO₃H 基を示す。

(7) GAG がヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、R¹ は 4 位に置換し、R¹ は NHCOCH₃ 基を示し、R¹ は CH₂ OH 基を示し、R¹ は OH 基を示す。

(8) GAG がコンドロイチン硫酸 A もしくは K 又はデルマトン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、R¹ は 4 位に置換し、R¹ は NHCOCH₃ 基を示し、R¹ は CH₂ OSO₃H 基を示し、R¹ は OSO₃H 基を示す。

(9) GAG がコンドロイチン硫酸 C 又は D から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、R¹ は 4 位に置換し、R¹ は NHCOCH₃ 基を示し、R¹ は CH₂ SO₃H 基を示し、R¹ は OH 基を示す。

(10) GAG がコンドロイチン硫酸 E から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、R¹ は 4 位に置換し、R¹ は NHCOCH₃ 基を示し、R¹ は CH₂ OSO₃H 基を示し、R¹ は OSO₃H 基を示す。

(11) GAG がコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAG は 3 位に、R¹ は 4 位に置換し、R¹ は NHCOCH₃ 基を示し、R¹ は CH₂ OSO₃H 基で R¹ は OSO₃H 基を示すか、又は R¹ は CH₂ OSO₃H 基で R¹ は OH 基もしくは OSO₃H 基を示す。

(12) GAG がヘパリンから還元性末端のヘキソサミ

ン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はNH₂SO₃H基を示し、R'はCH₂OSO₃H基を示し、R'はOH基を示す。

(13) GAGがヘパラン硫酸から還元性末端のヘキサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はNHCOCH₃基又はNH₂SO₃H基を示し、R'はCH₂OSO₃H基でR'はOSO₃H基を示すか、又はR'はCH₂OSO₃H基でR'はOH基もしくはOSO₃H基を示す。

(14) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はNHCOCH₃基を示し、R'はCH₂OSO₃H基を示し、R'はOH基を示す。]で示される請求項1の肝細胞球状集塊化剤。

【請求項7】 脂質がホスファチジルエタノールアミンであり、グリコサミノグリカンが還元性末端が開裂されたコンドロイチン硫酸Cである請求項1の肝細胞球状集塊化剤。

【請求項8】 脂質結合グリコサミノグリカンを培養基質として肝実質細胞を培養することを特徴とする球状集塊化肝細胞の培養法。

【請求項9】 請求項6の脂質結合グリコサミノグリカン培養基質とする請求項8の培養法。

【請求項10】 請求項7のホスファチジルエタノールアミンが結合したコンドロイチン硫酸Cを培養基質とする請求項8の培養法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、人工肝機能補助として機能する肝実質細胞の集塊を形成に関与する、脂質が共有結合したグリコサミノグリカンよりなる肝細胞球状集塊化剤、及び該集塊化剤を培養基質とする容器で肝細胞を培養する球状集塊化肝細胞の培養法に関する。

【0002】

【従来の技術】肝臓は、動物の代謝を司る重要な臓器であり、その機能は肝臓の約70%を示す肝実質細胞が担っている。また、その機能は肝実質細胞のみで発揮されるのではなく、非実質細胞や細胞外マトリックスとの相互作用と、それらに基づく組織の構築によって発揮される。つまり、生体では肝実質細胞が互いに接着し合った凝集集塊が形成されることによって生物活性を有する。

【0003】本発明者らは、先に肝細胞の機能を保持した肝実質細胞の集塊化培養法について研究し、高度な肝機能を維持し得る肝実質細胞の組織形態の再形成に係る物質を明らかにし、更に該物質の存在下に肝実質細胞を培養することにより長期間に亘り高度な機能を発現維持し得る細胞集塊を形成し、ある程度の組織構築を再現す

ることを可能にした。

【0004】すなわち、成熟ラットの肝臓からコラゲナーゼ門脈還流法により取得した分離肝実質細胞を、培養皿上に肝レクチリン線維由来のプロテオグリカンを塗布固相化した培養皿に接種し、EGF（上皮細胞増殖因子）、インシュリン等のホルモン添加無血清培地（HDM）で静置培養すると、図1に示すように、接種された肝細胞は初め単層として基質に接着しているが、以後時間の経過するに従い、互いに重なりあった多層島状となり、さらに収縮して球状の細胞集塊を形成し、培養皿表面から離れ、培養液中に浮遊する球状集塊となることを見出した[Cell Struct Funct 13, 179 (1988); Biochem. Biophys. Res. Commun 161, 385 (1989)]。

【0005】上記レクチリン由来のプロテオグリカンは、グリカン部分の構成がデルマタン硫酸、ヘパラン硫酸及び未知の糖からなることが判明したが、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、あるいはラット肝臓から抽出したコラーゲンやフィブロンネクチンのような接着性基質又は糖蛋白を固相化した基質では、肝細胞は培養皿に接着伸展し、単層のままであり、集塊化は起らなかった。

【0006】また陽性荷電プラスチック、例えばポリスチレン製プライマリアディッシュの培養皿で肝細胞を培養すると、プロテオグリカン塗布した培養皿で培養した場合と同様に浮遊した集塊となる。これはプラスチック皿上に接種された細胞がプロテオグリカンを分泌し、これが皿に吸着されるためと考えられている。[Exp. cell Res. 186, 227 (1990)] [特開平1-277486号公報]。

【0007】上記プロテオグリカン培養基質として形成された肝細胞は肝細胞が球状に集塊化したものであり、浮遊しており、比較的長期間培養してもその形態が保持されている。また、肝細胞の単層培養物と比べてアルブミンの産生分泌能が高く、長期間一定のレベルを維持していることから、肝細胞集塊化物は高度な肝特異的分化機能を維持しており、また細胞集塊化物は、H⁺ーチミジンの取り込み及び核ラベリングインデックスで測定する限り、細胞増殖活性は殆んどない特性を示すことから、生体に極めて近い組織構築の可能性を示した[J Clin Electron Microscopy 21, 5 (1988)]。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記レクチリン線維由来のプロテオグリカンの収量は多くなく、調製も容易ではない。そこでプロテオグリカンに代り、肝細胞の球状集塊化物を効率的に形成し、肝細胞の分化機能の発現維持に効力を示す培養基質の開発が求められている。また、生体外で生体内と同様な機能を保持したまま肝細胞を長期間培養することは、生物学的人工肝機能補助装置の開発のためにも必要である。

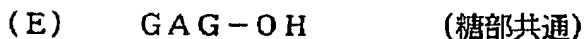
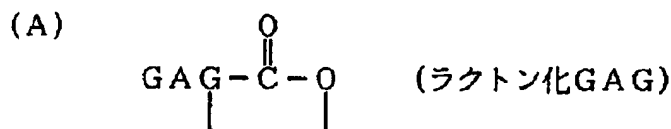
【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、脂質が共有結合したグリコサミノグリカンを含む肝細胞球状集塊化剤を提供するものである。本発明の該集塊化剤は、レチクリン線維由来のプロテオグリカンをはるかに超越する球状集塊形成効果と肝細胞の分化機能の発現維持を示す。

【0010】本発明の肝細胞球状集塊化剤は、グリコサミノグリカン（以下、「GAG」と略すこともある）と脂質が共有結合によって結合した脂質結合GAGを含むものであればよい。特に脂質結合GAGは、GAGのカルボキシル基（ラクトンを含む）、ホルミル基、水酸基または1級アミノ基と、脂質の1級アミノ基、カルボキシル基またはホルミル基との間で形成されるCONH結合、エステル結合またはCH₂NH結合によって共有結合したものが好ましい。とりわけ、以下の①～③の結合によって結合したものが好ましい。

【0011】①還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンのカルボキシル基と、脂質の1級アミノ基とから

(1) GAGまたはその誘導体



上式中、GAGはグリコサミノグリカン、 NH_2 は導入されたアミノ基を示す。

形成されたCONH結合、

②グリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシル基と、脂質の1級アミノ基とから形成されたCONH結合、または

③還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンのホルミル基と、脂質の1級アミノ基とから形成されたCH₂NH結合。

【0012】上記結合に関与する1級アミノ基、カルボキシル基、ホルミル基、水酸基は、GAGまたは脂質に元来存在するもの、これらに化学的処理を施すことによって形成されたもの、あるいは上記官能基を末端に具備するスペーサー化合物をあらかじめこれらと反応させることによって導入されたもののいずれであってもよい。

【0013】脂質結合GAGとその原料化合物との関係を模式的に示すと以下のとおりである。

【0014】

【化2】

(2) 脂質またはその誘導体

- (イ) 脂質-NH₂ (アミノ基を有する磷脂質)
 (ロ) 脂質~~~~NH₂ (アミノ基を導入した脂質)
 (ハ) 脂質~~~~COOH (カルボキシル基を導入した脂質)
 (ニ) $\text{脂質}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}$ (アルデヒド化脂質)

上式中、~~~~COOHは導入されたカルボキシル基を示す。

【0016】

【化4】

(3) 脂質結合GAG

- (a) (A) + (イ) \longrightarrow GAG-CONH-脂質
 (b) (A) + (ロ) \longrightarrow GAG-CONH~~~~脂質
 (c) (B) + (イ) \longrightarrow GAG-CH₂NH-脂質
 (d) (B) + (ロ) \longrightarrow GAG-CH₂NH~~~~脂質
 (e) (C) + (イ) \longrightarrow $\begin{array}{c} \text{CONH-脂質} \\ | \\ \text{GAG} \end{array}$
 (f) (C) + (ロ) \longrightarrow $\begin{array}{c} \text{CONH~~~~脂質} \\ | \\ \text{GAG} \end{array}$
 (g) (D) + (ハ) \longrightarrow GAG~~~~HNCO~~~~脂質
 (h) (D) + (ニ) \longrightarrow GAG~~~~HNCH₂-脂質
 (i) (E) + (ハ) \longrightarrow GAG-O-CO~~~~脂質

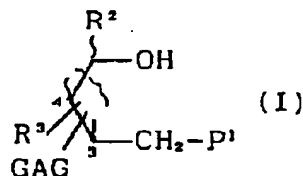
【0017】本発明で用いる脂質結合グリコサミノグリカンは、その塩であることができ、好ましくはナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属塩；カルシウム、マグネシウムのようなアルカリ土類金属塩；トリアルキルアミンのようなアミン塩；ピリジンのような有機塩基との塩であることができる。

【0018】本発明で用いる脂質結合グリコサミノグリカンは、次のものを包含する。

【0019】1. 一般式

【0020】

【化5】



【0021】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0022】上記式中、P¹は1級アミノ基を有する脂質を示し、GAGはグリコサミノグリカン残基であって、

【0023】(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸から還元性末端のグ

ルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹はCOOH基を示し、R¹はOH基を示す。

【0024】(2) GAGがコンドロイチン硫酸K又はコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹はCOOH基を示し、R¹はOSO₃H基を示す。

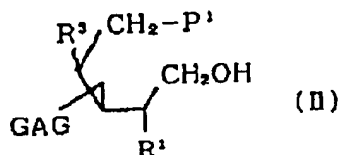
【0025】(3) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R¹はCH₂OH基を示し、R¹はOH基を示す。

【0026】(4) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R¹はCH₂OSO₃H基を示し、R¹はOH基を示す。

【0027】2. 一般式

【0028】

【化6】



【0029】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0030】上記式中、P¹は1級アミノ基を有する脂質を示し、

【0031】(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチンから還元性末端のヘキササミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R¹はNHCOCH₃基を示し、R¹はOH基を示す。

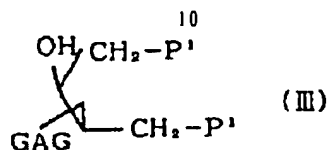
【0032】(2) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキササミン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R¹はNHCOCH₃基を示し、R¹はOH基を示す。

【0033】(3) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R¹及びR¹はOH基を示す。

【0034】3. 一般式

【0035】

【化7】



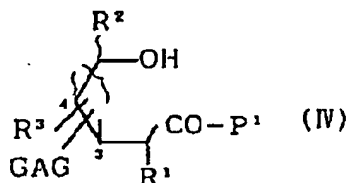
【0036】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0037】上記式中、P¹は1級アミノ基を有する脂質を示し、GAGはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示す。

10 【0038】4. 一般式

【0039】

【化8】



【0040】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

20 【0041】上記式中、P¹は1級アミノ基を有する脂質を示し、GAGはグリコサミノグリカン残基であって、

【0042】(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリン、又はヘパリン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹はOH基を示し、R¹はCOOH基を示し、R¹はOH基を示す。

【0043】(2) GAGがコンドロイチン硫酸Dから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはヘパリン又はヘパリン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹はOSO₃H基を示し、R¹はCOOH基を示し、R¹はOH基を示す。

40 【0044】(3) GAGがコンドロイチン硫酸Kから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹はOH基を示し、R¹はCOOH基を示し、R¹はOSO₃H基を示す。

【0045】(4) GAGがコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹およびR¹の少なくとも一つはOSO₃H基を示し、他はOH基を示し、R¹はCOOH基を示す。

50 【0046】(5) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R¹

及びR'はOH基を示し、R'はCH₂、OH基を示す。

【0047】(6) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'及びR'はOH基を示し、R'はCH₂、OSO₂、H基を示す。

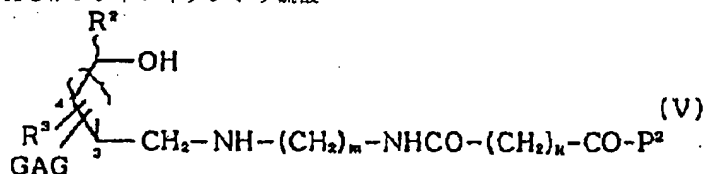
【0048】(7) GAGがヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はNHCOCH₃、基を示し、R'はCH₂、OH基を示し、R'はOH基を示す。

【0049】(8) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はNHCOCH₃、基を示し、R'はCH₂、OH基を示し、R'はOSO₂、H基を示す。

【0050】(9) GAGがコンドロイチン硫酸C又はDから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はNHCOCH₃、基を示し、R'はCH₂、SO₃、基を示し、R'はOH基を示す。

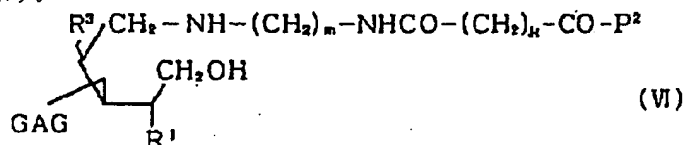
【0051】(10) GAGがコンドロイチン硫酸Eから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はNHCOCH₃、基を示し、R'はCH₂、OSO₂、H基を示し、R'はOSO₂、H基を示す。

【0052】(11) GAGがコンドロイチンポリ硫酸



【0058】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0059】上記式中、P'は脂質を示し、GAG、R'及びR'は式(I)に記載と同じである。mは1~8を示し、kは1~10を示す。



【0062】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0063】上記式中、GAG、R'及びR'は式(I)に記載と同じであり、m、k及びP'は式(V)に記載と同じである。

から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はNHCOCH₃、基を示し、R'はCH₂、OH基でR'はOSO₂、H基を示すか、又はR'はCH₂、OSO₂、H基でR'はOH基もしくはOSO₂、H基を示す。

【0053】(12) GAGがヘパリンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はNHCOCH₃、H基を示し、R'はCH₂、OSO₂、H基を示し、R'はOH基を示す。

【0054】(13) GAGがヘパリン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はNHCOCH₃、基又はNHCOCH₃、H基を示し、R'はCH₂、OH基でR'はOSO₂、H基を示すか、又はR'はCH₂、OSO₂、H基でR'はOH基もしくはOSO₂、H基を示す。

【0055】(14) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はNHCOCH₃、基を示し、R'はCH₂、OSO₂、H基を示し、R'はOH基を示す。

【0056】5. 一般式

【0057】

【化9】

【0060】6. 一般式

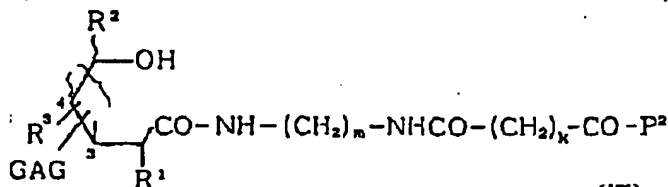
【0061】

【化10】

【0064】7. 一般式

【0065】

【化11】



(VII)

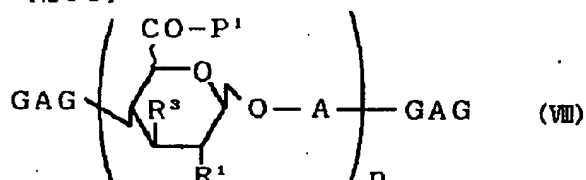
【0066】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0067】上記式中、GAG、 R^1 、 R^2 及び R^3 は式 (IV) に記載と同じであり、 m 、 k 及び P^2 は式 (V) に記載と同じである。

【0068】8. 一般式

【0069】

【化12】



【0070】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0071】上記式中、 P^1 は1級アミノ基を有する脂質を示し、 n はグリコサミノグリカンに存在するカルボキシ基の数以下を示し、 A はGAGの種類によって特定されるヘキサミンまたはその硫酸エステルを示し、

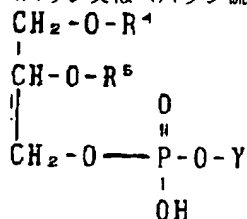
【0072】(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、又はデルマタン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 及び R^3 はOH基を示す。

【0073】(2) GAGがコンドロイチン硫酸Dのグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 はOSO₃H基を示し、 R^3 はOH基を示す。

【0074】(3) GAGがコンドロイチン硫酸Kのグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 はOH基を示し、 R^3 はOSO₃H基を示す。

【0075】(4) GAGがコンドロイチンポリ硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 及び R^3 の少なくとも一つはOSO₃H基を示し、他はOH基を示す。

【0076】(5) GAGがヘパリン又はヘパラン硫酸



【0082】(式中、 R^1 及び R^3 はそれぞれ水素、 CH=CHR^1 又は -COR^1 (R^1 及び R^3 はC₁、 \sim 、のアルキル基)であり、 Y は -CH_2 、 CH_2 、 NH_2 、又は

【0083】

【化14】

のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 はOH基又はOSO₃H基を示し、 R^3 はOH基を示す。

【0077】グリコサミノグリカンとしては、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸(コンドロイチン硫酸B)、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸が例示される。

【0078】グリコサミノグリカンの分子量は好ましくは1,000~100万のものが用いられる。

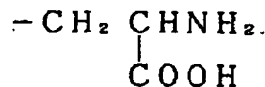
【0079】上記式(V)、(VI)又は(VII)で表される脂質結合GAGを製造する際に原料として使用する1級アミノ基を導入したGAGは、後述の方法によってGAGの還元末端を開裂させて得られるラクトン化GAGまたはアルデヒド化GAGとNH₂-(CH₂)_n-NH₂で表わされるアルキレンジアミンを反応させることによって製造することができる。このような1級アミノ基を導入したGAGは、上記アルキレンジアミンの代りにリジンなどの2個のアミノ基を有するアミノ酸を反応させることによっても得ることができる。また、アルキレンジアミン、アミノ酸はGAGのウロン酸部分のアミノ基と反応させることもできる。

【0080】上記式(I)、(II)、(III)、(IV)及び(VIII)の P^1 で示される脂質残基の原料である1級アミノ基を有する脂質としては、下式(IX)で表わされるホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルトレオニンなどの磷脂質が例示される。

【0081】

【化13】

(IX)

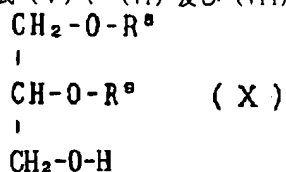


【0084】である)で示されるものが用いられる。特に R^1 及び R^3 がともにパルミトイル(ヘキサデカノイル)又はステアロイル(オクタデカノイル)のような一

15

COR' であるか、R' が $-\text{CH}=\text{CHR}'$ で R' が $-\text{COR}'$ であるものが好ましい。

【0085】また、上記式 (V)、(VI) 及び (VII) の

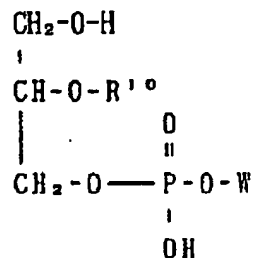
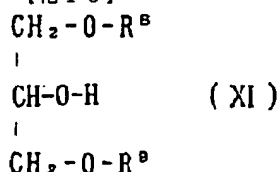


16

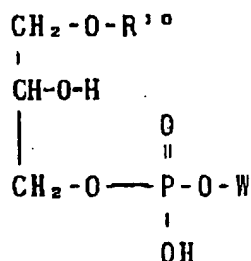
P' で示される脂質残基の原料である脂質としては、

【0086】

【化15】



(XII) 又は



(XIII)

【0087】(式中、R'、R' 及び R'' はそれぞれ水素、アルキル基、 $-\text{CH}=\text{CHR}'$ 又は $-\text{COR}'$ (R' 及び R' は前記と同じ) であり、W は $-\text{CH}_2$ 、 CH 、 $\text{N}^+(\text{CH}_3)$ 、又はイノシトール残基である)

【0088】で示されるものが用いられる。特に R' 及び R' がともにパルミトイル (ヘキサデカノイル) 又はステアロイル (オクタデカノイル) のような $-\text{COR}'$ であるか、R' が水素で、R' が $-\text{COR}'$ である式 (X) 又は (XI) の脂質、或いは R'' が $-\text{COR}'$ である式 (XII) 又は (XIII) の磷脂質が好ましい。

【0089】上記式 (V)、(VI) 又は (VII) で表わされる脂質結合 GAG を製造する際に原料として使用するカルボキシル基を導入した脂質は、後述の水酸基を有する脂質とジカルボン酸を反応させることによって製造することができる。

【0090】なお、前記 (二) のアルデヒド化脂質は、

例えばグリセルアルデヒドの水酸基をアシル化またはエーテル化することによって製造することができる。

【0091】以下に、本発明の磷脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造法について詳しく説明する。

【0092】還元末端限定酸化法

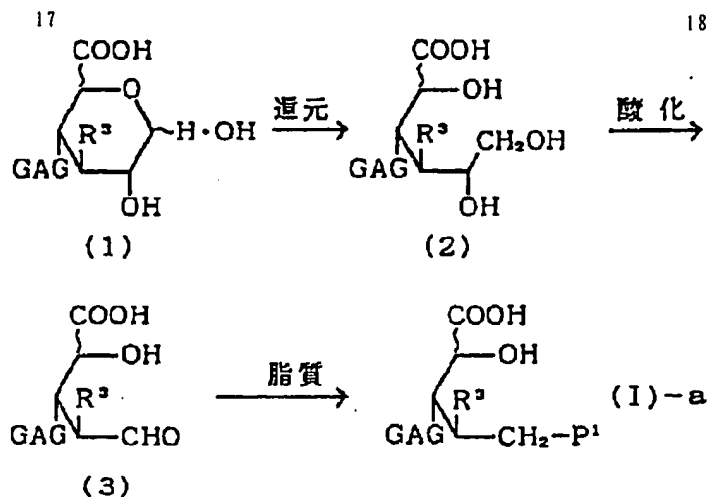
この方法は、グリコサミノグリカンの還元性末端のウロン酸部分もしくはガラクトース部分又はヘキササミン部分を還元及び部分酸化することにより開裂させてアルデヒドを形成させ、このアルデヒドと脂質の1級アミノ基との間の還元的アルキル化反応により、脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。この方法を反応式で示せば次のとおりである。

【0093】(A) 還元性末端糖のグルクロン酸又はイズロン酸に反応する場合

【0094】

【化16】

40



【0095】(R¹ は前述と同じ、P¹ は1級アミノ基を有する脂質を示す)

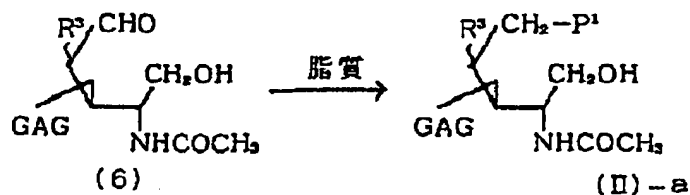
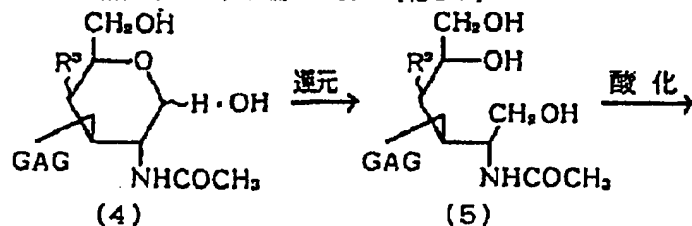
【0096】還元性末端がC-2にOHを有するD-グルクロン酸又はL-イブロン酸である式(1)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイトン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫

酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(I)-aの脂質結合グリコサミノグリカンが製造できる。

【0097】(B)還元性末端糖のグルコサミン又はガラクトサミンに反応する場合

【0098】

【化17】



【0099】(式中、R¹ は前述と同じ、P¹ は1級アミノ基を有する脂質を示す)

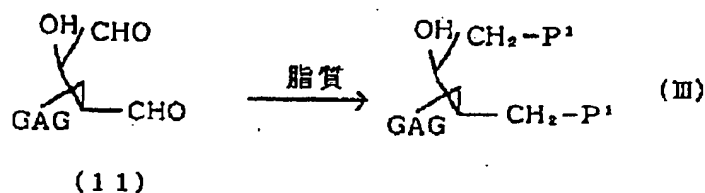
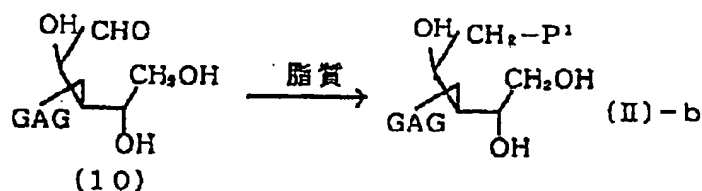
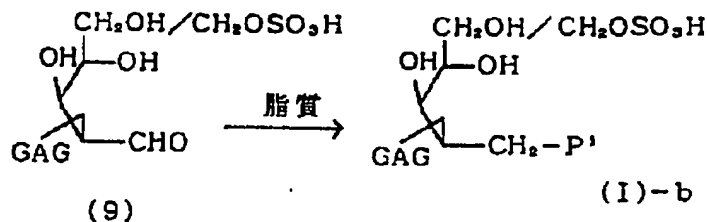
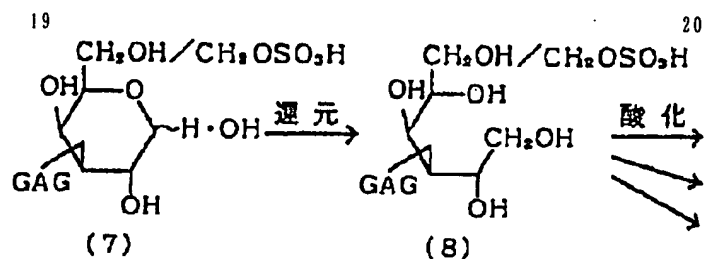
【0100】還元性末端のC-6に水酸基(OH)を有するグルコサミン又はガラクトサミンである式(4)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸を原料として使用したとき、上記反応

式に従い、式(II)-aの脂質結合グリコサミノグリカンが製造できる。

【0101】(C)還元性末端糖のガラクトースに反応する場合

【0102】

【化18】



【0103】（式中、P' は1級アミノ基を有する脂質を示す）

【0104】還元性末端糖がガラクトースである式

(7) のケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式 (I) - b、

(II) - b 及び (III) の脂質結合グリコサミノグリカン 40 が製造できる。

【0105】上記 (A)、(B) 又は (C) の方法においては、先ず、上記式 (1)、(4) 又は (7) で示されるグルコサミノグリカン還元して還元性末端糖部分を開裂させて式 (2)、(5) 又は (8) の化合物とする。

【0106】この還元を使用しうる還元剤としては、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどの水素化ホウ素アルカリ塩等を用いることができる。

【0107】また、上記還元反応における溶媒は、水又は0.05M ホウ酸塩緩衝液 (pH8.3) 等を用いることができる。

【0108】また還元反応温度は、通常10~30℃、好ましくは15~25℃で行うことができる。

【0109】還元剤の使用量は、その種類等によっても異なるが、一般には式 (1)、(4) 又は (7) の化合物1モルに対して5~50当量、好ましくは25~30当量の範囲である。

【0110】得られる式 (2)、(5) 又は (8) の化合物を次いで部分的に酸化すると、式 (3)、(6)、(9)、(10) 又は (11) のアルデヒド化合物が生成する。

【0111】この酸化反応に使用しうる酸化剤としては、過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウムなどの過ヨウ素酸アルカリ塩等を用いることができる。

【0112】酸化剤の使用量は、式(2)、(5)又は(8)の化合物1モルに対して1~10当量、好ましくは3~6当量の範囲である。

【0113】酸化反応温度は、0~10℃、好ましくは0~4℃の範囲で行うことができる。

【0114】生成した(3)、(6)、(9)、(10)又は(11)のアルデヒド化合物は、それ自体既知の還元的アルキル化法に従い、脂質の1級アミノ基と反応させることができ、これによって本発明の球状集塊化剤として有効な一般式(I)、(II)又は(III)で示される脂質結合グリコサミノグリカンを得ることができる。

【0115】上記反応に用いることのできる脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、エタノールアミンプラスマロゲン、セリンプラスマロゲン等を挙げることができる。

【0116】上記還元的アルキル化反応は、水、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)又はジメチルホルムアミ

ドのような溶媒中において、式(3)、(6)、

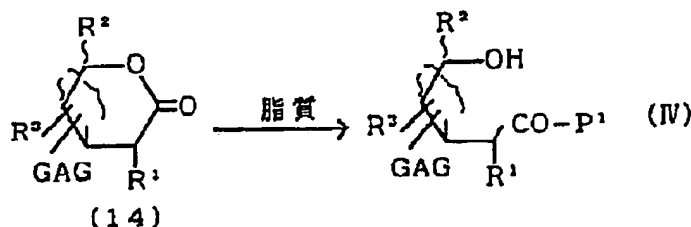
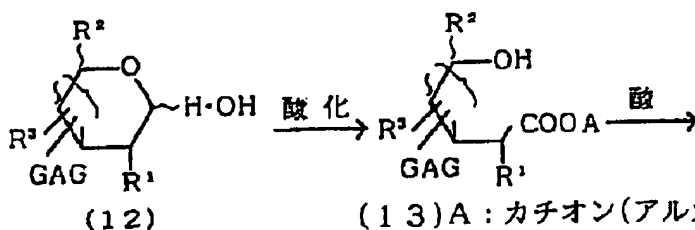
(9)、(10)又は(11)のアルデヒド化合物とクロロホルム等に溶解した脂質とを混合して均一な溶液にし、通常15~60℃の温度で反応させ、それと同時に又はその後に、例えばシアノ水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤を用いて還元することにより一般式(I)、(II)又は(III)の化合物を製造することができる。

【0117】還元末端ラクトン化法

この方法は、グリコサミノグリカンの還元性末端ウロン酸部分もしくはガラクトース部分又はヘキソサミン部分を酸化することにより該末端糖部分を開裂させ、更にラクトンを形成させて、このラクトンと脂質の1級アミノ基との反応により脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。この方法を反応式で示せば次のとおりである。

【0118】

【化19】



【0119】(式中、R'、R'及びR'は前述と同じ、P'は1級アミノ基を有する脂質を示す)

【0120】本方法において、先ず、式(12)で示されるグリコサミノグリカンを酸化して還元性末端部分を開裂させ、式(13)のカルボキシ化合物とする。

【0121】式(12)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸を原料として使用することができる。

【0122】この酸化に使用しうる酸化剤としては、ヨウ素、臭素等を用いることができる。

【0123】酸化剤の使用量は、式(12)の化合物1モルに対して2~20当量、好ましくは5~15当量の範囲である。

【0124】酸化反応における溶媒は、水又は0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)等を用いることができる。

【0125】酸化反応温度は、0~40℃、好ましくは15~20℃で行うことができる。

【0126】生成する式(13)の化合物は、次いで酸で処理することにより式(14)のラクトン化合物にすることができる。

【0127】ここで用いることのできる酸としては、強酸性陽イオン交換樹脂、例えばダウエックス50(商品名;ダウ・ケミカル社製)、アンバーライト1R120(商品名;オルガノ(株)製)等を挙げることができる。

【0128】得られる式(14)のラクトン化合物は、次いで1級アミノ基を有する脂質と反応させることにより、前記一般式(IV)の脂質結合グリコサミノグリカン

【0129】上記反応に用いることのできる脂質としては、前記還元末端限定酸化法において例示したものをを用いることができる。

【0130】式(14)のラクトン化合物と脂質との反応は、水、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)又はジメチルホルムアミド等に溶解した式(14)のラクトン化合物と、クロロホルム等に溶解した脂質とを混合して均一な溶液にし、5~80℃、好ましくは30~60℃の温度で反応させることにより一般式(IV)の化合物を製造することができる。

【0131】還元末端アミン法

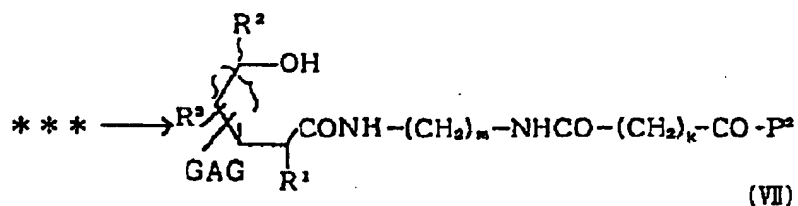
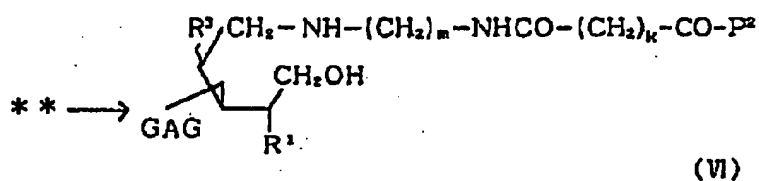
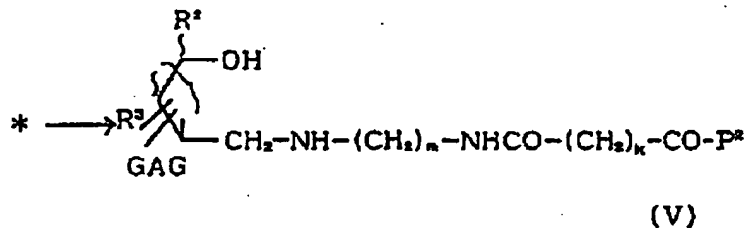
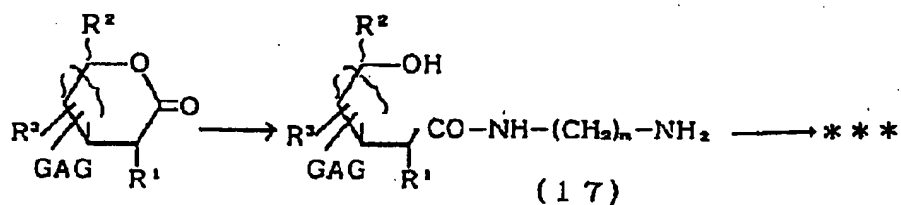
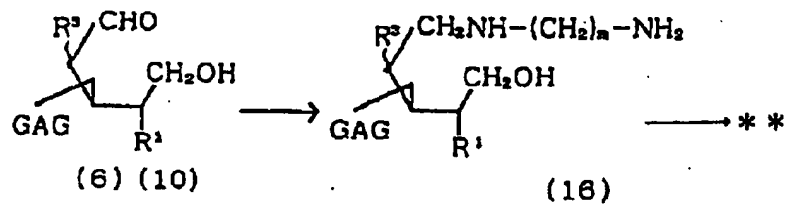
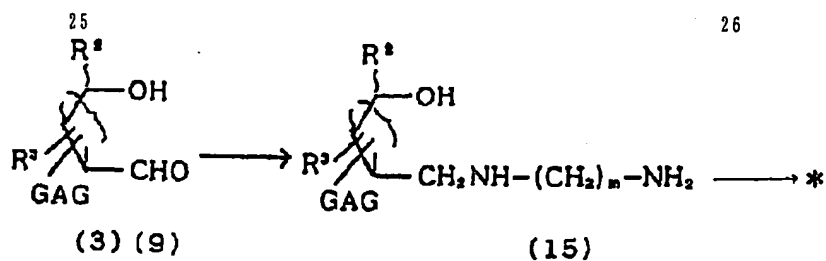
この方法は、前記式(3)、(6)、(9)もしくは

(10)のアルデヒド化合物又は(14)のラクトン化合物にアルキレンジアミンを反応させ、末端に1級アミノ基が導入されたグリコサミノグリカン誘導体とし、次にこの1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体とカルボキシル基が導入された脂質誘導体とを反応させ、アミノ基とカルボキシル基との結合により、脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。

【0132】この方法を反応式で示せば次のとおりである。

10 【0133】

【化20】



【0134】（式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は前述と同じ、 P^2 は脂質を示す）

【0135】還元末端に1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体式（15）、（16）及び（17）

は、前記還元末端限定酸化法又は還元末端ラクトン化法によって製造される式（3）、（6）、（9）、（10）及び（14）の化合物とアルキレンジアミンとを還元剤の存在下で反応させることによって得られる。

【0136】この反応に使用できるアルキレンジアミンとしては一般式

【0137】 $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_m - \text{NH}_2$

【0138】(式中、 m は1~8の整数)

【0139】で示される化合物を用いることができる。

【0140】還元剤としては、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等を用いることができる。

【0141】還元剤の使用量は、上記反応に使用するグリコサミノグリカンのモル数の10~100倍モル量である。

【0142】反応溶媒は、水又は0.05Mリン酸緩衝液等を用いることができる。

【0143】反応温度は、0~60℃、好ましくは4~25℃で行う。

【0144】また、カルボキシル基をもつ脂質誘導体は、グリセロール骨格に水酸基をもつ脂質とジカルボン酸又はその反応性誘導体(酸無水物、ハロゲン化物など)とを反応させて得られる。

【0145】この反応に使用できる脂質としては、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、リゾホスファチジルコリン又はリゾホスファチジイルノシトール、水酸基を有するエテル脂質もしくは燐脂質等を用いることができる。

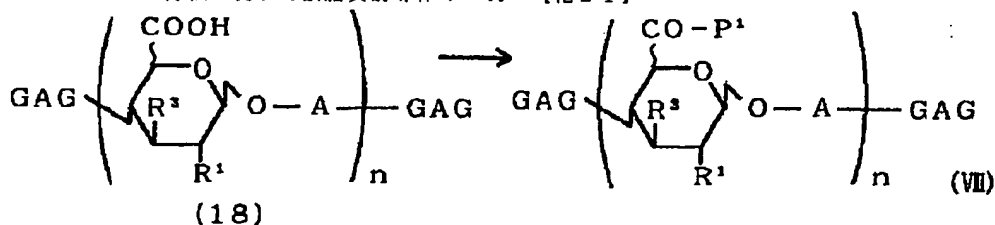
【0146】ジカルボン酸又はその反応性誘導体としては、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、フマル酸、マレイン酸、テレフタル酸又はその酸無水物、ハロゲン化物(塩化物など)を用いることができる。

【0147】縮合剤を使用する場合、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

【0148】反応溶媒としては、クロロホルム、アセトアニリド、ジメチルホルムアミド等を用いることができる。

【0149】反応温度は、縮合剤の存在下でジカルボン酸を使用するときは0~60℃を、また無水ジカルボン酸を使用するときは20~80℃で行うことができる。

【0150】還元末端に1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体とカルボキシル基をもつ脂質誘導体とを反応させる方法は、先ず該脂質誘導体をペプチド化学の分野でよく知られている方法に従って該脂質誘導体の



【0162】(式中、 R^1 、 R^2 、 A 及び P^1 は前述と同じ)

【0163】本方法で原料として用いることのできるグ

カルボキシル基を活性化し、次いで該グリコサミノグリカン誘導体と反応させる方法で行うことができる(「ペプチド合成の基礎と実験」、泉屋信夫、臨道典ら著、昭和60年、丸善(株)発行)。

【0151】上記脂質誘導体のカルボキシル基を活性化する方法としては、上記脂質誘導体とN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシピペリジン、N-ヒドロキシスクシンアミド、2,4,5-トリクロロフェニルノール等とを縮合剤の存在下で反応させ、該カルボキシル基を活性エステルに変える方法で行うことができる。

【0152】反応溶媒としては、クロロホルム、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド又は該溶媒の混合液を用いることができる。

【0153】縮合剤としては、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

【0154】反応温度は、0~60℃で行う。

【0155】上記方法によって得られたカルボキシル基が活性化された上記脂質誘導体と、1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体(15)(16)又は(17)とを反応させれば、脂質結合グリコサミノグリカン(V)、(VI)又は(VII)を得ることができる。

【0156】上記反応溶媒としては、クロロホルム、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド又は該溶媒の混合液を用いることができる。

【0157】また、反応温度は、0~60℃で行う。

【0158】縮合剤使用法

ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸以外のグリコサミノグリカンはD-グルクロン酸又はL-イズロン酸を含有し、これらのウロン酸はC-5にカルボキシル基を有する。

【0159】この方法は、ウロン酸のカルボキシル基と脂質の1級アミノ基とを縮合剤の存在下で反応させ、脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。

【0160】この方法を反応式で示せば次のとおりである。

【0161】

【化21】

リコサミノグリカン(18)は、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コ

ンドロイチン硫酸 K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸である。

【0164】脂質としては、前記還元末端限定酸化法において例示したものをを用いることができる。

【0165】縮合剤としては、ジエチルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、メチルプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ヘキサメチレンカルボジイミド、ヘプタメチレンカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-10 モルホリノエチル)カルボジイミド・メソ-p-トルエンスルホネート、1-t-ブチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジフェニルカルボジイミド、4, 4'-ジニトロジフェニルカルボジイミド、ジ-p-トリルカルボジイミド又はビス(トリメチルシリル)カルボジイミド等を挙げることができる。

【0166】縮合剤の使用量は、脂質の使用モル量の10~100倍モル量を用いることができる。

【0167】溶媒としては、ジメチルホルムアミド、クロロホルム又は該溶媒の混合液等を用いることができる。

【0168】反応温度は、4~60℃、好ましくは15~25℃で行う。

【0169】グリコサミノグリカン活性化法

この方法は、上記縮合剤使用法と同様に、ウロン酸のカルボキシル基を、脂質の1級アミノ基と結合させることにより、磷脂質結合グリコサミノグリカン(VIII)を製造する方法であって、反応に際してカルボキシル基を活性化する方法である。

【0170】本方法で使用するのことができるグリコサミノグリカン及び脂質としては、上記縮合剤使用法と同様のものをを用いることができる。

【0171】カルボキシ基を活性化する方法としては、ペプチド化学の分野でよく知られている方法に従って、グリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシ基を活性化することができる(「ペプチド合成の基礎と実験」前記)。

【0172】活性化する方法としては、例えばグリコサミノグリカンにN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシピペリジン、N-ヒドロキシスクシンアミド、2, 4, 5-トリクロロフェノール等を縮合剤の存在下で反応させて、該カルボキシル基を活性エステルに変えることができる。

【0173】ウロン酸部分のカルボキシル基はそのアミン、有機塩基、アルカリ金属等との塩として反応させることもできる。

【0174】アミンとしては、トリ(n-ブチル)アミン、トリエチルアミン等を、有機塩基としてはピリジン等を、アルカリ金属としてはナトリウム、カリウム等を

挙げることができる。

【0175】反応溶媒としては、ジメチルホルムアミド、ピリジン、ジメチルスルホキシド等を用いることができる。

【0176】縮合剤としては、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

【0177】反応温度は、0~60℃、好ましくは4~20℃で行う。

【0178】上記方法によって得られた、カルボキシル基が活性化されたグリコサミノグリカン(IX)を脂質と反応させれば、一般式(VIII)の磷脂質結合グリコサミノグリカンを得ることができる。

【0179】上記反応は、ジメチルホルムアミド、クロロホルム又は該溶媒の混合液の溶液において、上記活性化グリコサミノグリカンと脂質とを0~90℃、好ましくは25~60℃で反応させる。

【0180】また、本発明の一般式(I)~(VIII)で示される磷脂質結合グリコサミノグリカンの脂質の含有量は、0.005~50%、好ましくは2~10%の範囲である。

【0181】以上に述べた各種の方法で製造される磷脂質結合グリコサミノグリカンの分離、精製方法としては、反応液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱物をろ取することで未反応の脂質を除き、さらに該沈澱物を疎水クロマトに負荷し、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、塩化ナトリウム等の塩の水溶液で洗浄することで未反応のグリコサミノグリカン(IX)を除去する。その後、該疎水クロマトに吸着した磷脂質結合グリコサミノグリカンを10~50%メタノール水溶液で溶出する方法で行うことができる。

【0182】上記磷脂質が結合したグリコサミノグリカンの製造例は、特願平2-193816号明細書もまた参照される。

【0183】本発明の肝細胞球状集塊化剤として用いられる磷脂質結合グリコサミノグリカンの内、式(IV)で表わされる磷脂質結合グリコサミノグリカンが好適に用いられる。内でもホスファチジルエタノールアミンと還元末端が開裂されたコンドロイチン硫酸Cとが共有結合したものが最も好適に用いられる。

【0184】上記肝細胞球状集塊化剤を用いて肝実質細胞を培養するには、磷脂質結合グリコサミノグリカンを培養基質として、肝実質細胞を公知の方法で培養することにより、球状集塊化肝細胞が得られる。すなわち、具体的には培養容器の細胞との接触面に上記球状集塊化剤を塗布して培養する方法が採用できる。

【0185】培養容器としては、好ましくは前記公知の陽性荷電プラスチック、例えばポリスチレン製ブライマリアデッシュが用いられる(特開平1-296982号公報参照)。該容器の表面に磷脂質又は脂質が結合した

グリコサミノグリカンの溶液を培養基質として塗布し、コートした後、単離肝細胞を播種し、ホルモン添加無血清培地（ウイリアムス # E 培地等）中で約 37℃ で培養する。培地は適宜新しい培地と交換して 6 時間～数日間培養する。肝細胞は初め単層を形成するが、次第に多層島状の半集塊を形成し、更に集塊が進むと球状に凝集して集塊化し、培養皿から離れて培養中に浮遊するようになる。このようにして形成した球状集塊の直径は 50～150 μm、好ましくは 70～120 μm であり、また細胞数は 50～300 個、好ましくは 70～250 個により形成される。

【0186】脂質結合グリコサミノグリカンの存在下では、肝細胞が培養基質との接着が阻害され、集塊するものと考えられ、集塊化の活性は、脂質結合グリコサミノグリカンが、新生ハムスター腎細胞（BHK細胞）等のフィブロネクチン基質への接着を阻害する接着阻害率と相関がある。

【0187】上記接着阻害活性の大きい脂質結合グリコサミノグリカンほど低濃度で集塊を形成する。好ましくは細胞接着阻害活性が後記実施例に記載の方法で測定される 50% 阻害に必要な濃度（IC₅₀）として 400 μg/ml 以下であるものが用いられる。一方グリコサミノグリカン自体を用いても集塊化せず、また陽性荷電プラスチックの培養容器（プライマリアディクス）などのみ又は従来のプロテオグリカンと比べて、脂質結合グリコサミノグリカンを培養基質とすることによって、はるかに短時間で集塊効果を示したことは全く意外であり、肝細胞の実用的培養が可能となった。

【0188】かくして得られる肝細胞の集塊化物は、アルブミンの産生分泌能が高く、肝特異的分化機能を維持していることが確認された。また集塊化物は H⁺、ーチミジンの取り込みがほとんどないことから細胞増殖は抑制されており、ガンのような増殖と区別された。

【0189】

【発明の効果】本発明により、肝特異的機能を維持し、長時間安定に集塊化し、浮遊した肝細胞を効率的に得ることができる。脂質が共有結合したグリコサミノグリカンは、プロテオグリカンと異なり、人工的に容易に製造できる細胞外マトリックスであるので、人工肝機能補助装置の開発の助けになるものである。

【0190】

【実施例】以下に本発明の実施例を示す。

【0191】参考例

還元末端ラクトン化による脂質結合グリコサミノグリカンの製造

【0192】（1）還元末端酸化グリコサミノグリカンの製造

1）還元末端酸化ヒアルロン酸の製造

500mg のヒアルロン酸（鶏冠由来、MW1 万：HA1）を水 10ml に溶解し、0.1M ヨウ素のメタノール溶液 5ml を加えて室温で 6 時間反応させた。その後、反応液に 0.1N 水酸化カリウムを約 5ml 加えて遊離のヨウ素の色を消失させた。この溶液に酢酸カリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱をろ取り、充分にエタノールで洗浄し、減圧乾燥した。

【0193】これによりロット番号 400 の還元末端酸化ヒアルロン酸（カリウム塩）423mg を得た。

【0194】ソモジーネルソン法による還元糖の有無：無

【0195】2）還元末端ラクトンヒアルロン酸の製造
400mg のロット番号 400 の還元末端酸化ヒアルロン酸を水 10ml に溶解し、強酸性イオン交換樹脂（Dowex 50（H⁺））50ml に 1 時間を要して通過させ、還元末端ラクトンヒアルロン酸 390mg を含む水溶液を得た。

【0196】ソモジーネルソン法による還元糖の有無：無

【0197】上記の水溶液をトリ-*n*-ブチルアミンで中和し、凍結乾燥して還元末端ラクトンヒアルロン酸のトリ-*n*-ブチルアミン塩（ロット番号 500）400mg を得た。

【0198】3）他の還元末端ラクトングリコサミノグリカンの製造方法

コンドロイチン（MW1.5 万：CH）、コンドロイチン硫酸 C（MW1 万：CS（S1）、MW3 万：CS（S3）及び MW6 万：CS（S6））、デルマタン硫酸（MW1.5 万：DS）、ヘパリン（MW1.5 万：Hep）、及びヘパラン硫酸（MW1.5 万：HS）

【0199】を原料として、上記 1）に準じて表 1 の条件で還元末端酸化グリコサミノグリカンを製造した。ひきつづき、上記 2）に準じて表 2 の条件で還元末端ラクトングリコサミノグリカンを製造した。

【0200】

【表 1】

表 1

ロット番号	生成物	反応条件 GAG/0.1M-I ₂ /0.1N-KOH(mg/ml/ml)	収量 (mg)	ソモジー ネルソン
401	CH-COOK	1000/13.4/13.4	823	—
402	CS(S1)-COOK	1000/19.8/19.8	901	—
402-2	CS(S3)-COOK	1000/ 3.3/ 3.3	895	—
402-3	CS(S6)-COOK	1000/4.95/4.95	913	—
404	DS-COOK	100/0.67/0.67	91	—
405	Hep-COOK	1000/ 6.7/ 6.7	902	—
406	HS-COOK	100/1.34/1.34	88	—

ソモジーネルソン；ソモジーネルソン法による還元糖の有無（有は+、無は-で示す）

【0201】

【表2】

表 2

ロット番号	生成物	反応条件 GAG-COOK/Dowex50 (H ⁺) (mg/ml)	収量 (mg)	ソモジー ネルソン
501	CH-ラクトン	800/400	780	—
502	CS(S1)-ラクトン	900/450	805	—
502-2	CS(S3)-ラクトン	800/400	850	—
502-3	CS(S6)-ラクトン	900/450	887	—
504	DS-ラクトン	90/100	96	—
505	Hep-ラクトン	900/400	946	—
506	HS-ラクトン	80/40	72	—

ソモジーネルソン；ソモジーネルソン法による還元糖の有無（有は+、無は-で示す）

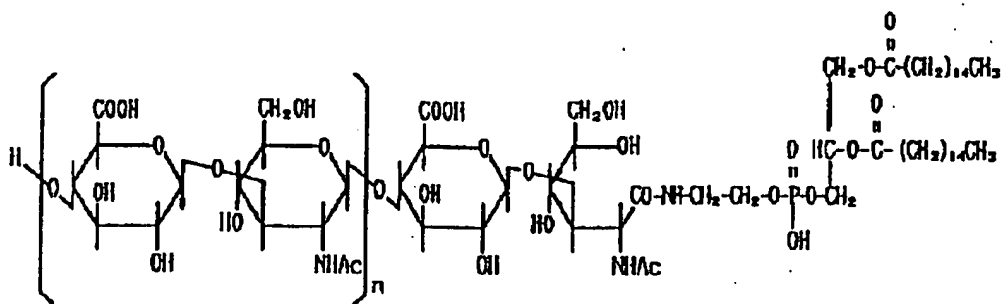
【0202】(2) L- (α-ホスファチジル) エタノールアミン・ジ
アルミニウム・ジパルミトイル (PPEADP) 結合グリ
コサミノグリカンの製造

1) L- (α-ホスファチジル) エタノールアミン・ジ

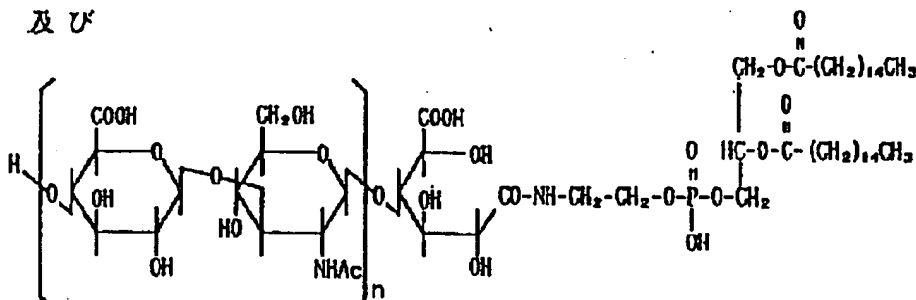
パルミトイル結合ヒアルロン酸の製造

【0203】

【化22】



及び



n : 平均 25

【 0 2 0 4 】 4 0 0 m g の ロ ッ ト 番 号 5 0 0 の 還 元 末 端 ラ
ク ト ン ヒ ア ル ロ ン 酸 を 2 0 0 m l の ジ メ チ ル ホ ル ム ア ミ ド
に 溶 解 し、 2 7 . 6 m g の P P E A D P の ク ロ ロ ホ ル ム 溶
液 を 加 え て、 7 0 ℃ で 2 時 間 反 応 さ せ、 ク ロ ロ ホ ル ム を
溜 去 し、 過 剰 の 酢 酸 ナ ト リ ウ ム 水 溶 液 を 加 え て ナ ト リ ウ
ム 塩 に し て か ら、 酢 酸 ナ ト リ ウ ム 飽 和 エ タ ノ ー ル を 加 え
た。 生 じ た 沈 澱 を ろ 取 し、 0 . 3 M 酢 酸 ア ン モ ニ ウ ム 溶
液 に 溶 解 し、 疎 水 ク ロ マ ト カ ラ ム (T S K g e l フ ェ ニ ル
ト ヨ パ ー ル 6 5 0 M (東 ソ ー (株) 製) 4 0 0 m l) に 吸
着 し、 充 分 に 0 . 3 M 塩 化 ア ン モ ニ ウ ム 水 溶 液 で 洗 淨
し、 3 0 % メ タ ノ ー ル 水 溶 液 で 溶 出 し た。 素 通 り 及 び 洗
淨 画 分 に 未 反 応 ヒ ア ル ロ ン 酸 が 溶 出 さ れ、 3 0 % メ タ ノ
ー ル 水 溶 液 に よ る 溶 出 画 分 に 目 的 と す る 本 品 が 溶 出 し
た。 3 0 % メ タ ノ ー ル 水 溶 液 溶 出 画 分 を 減 圧 下 濃 縮 し、
透 析 で 脱 塩 後、 凍 乾 乾 燥 し て 精 製 し、 ロ ッ ト 番 号 6 0 0

の目的物 36 mgを得た。

【0205】リン含量：0.3.0%

PPEADP含量: 6.44%

ヒアルロン酸含量：82.37%

【0206】2) その他のL- (α -ホスファチジル)
エタノールアミン・ジパルミトイル結合グリコサミノグ
リカンの製造

表2に示した還元末端ラクトングリコサミノグリカンとPPEADPとを表3に示した条件で、上記(2)-1)の方法に準じて反応させ、表3のPPEADP結合グリコサミノグリカンを製造した。得られた生成物の分析値を表4に示した。

【0207】

【表 3】

表 3

ロット番号	生成物	反応条件 (mg/mg) GAG-ラクトン/PPEADP
601	CH-PPEADP	700/32.3
602	CS(S1)-PPEADP	800/55.4
602-2	CS(S3)-PPEADP	400/9.26
602-3	CS(S6)-PPEADP	800/9.00
604	DS-PPEADP	90/4.15
605	Hep-PPEADP	800/36.91
606	HS-PPEADP	70/3.31

【 0 2 0 8 】

【表 4】

表4

ロット番号	収量 (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
601	70.2	4.30	90.90
602	88.0	6.41	85.17
602-2	20	2.01	89.70
602-3	56.2	1.08	92.00
604	4.5	4.00	90.66
605	24	4.11	90.01
606	5.74	4.22	88.21

【0209】実施例1

1) 培養容器 (ディッシュ) への磷脂質結合グリコサミノグリカンの塗布 (コート)

各種濃度の下記表5の磷脂質結合グリコサミノグリカンをハックス (Hanks') 溶液に溶解後、2mlづつプライマリアディッシュ (Falcon 3802、ベクトン・ディッキンソン社販売、60mm) に加え、4℃で1晩かけてコートした。

【0210】コート後、ディッシュをハックス溶液で2回洗浄した。ホルモン添加無血清培地 (HDM) に単離肝細胞を 3×10^5 細胞/ml の濃度で懸濁し、4mlづつ播種した。以下、常法にしたがって培養を行い、1日目、2日目に顕微鏡観察、写真撮影を行った。

【0211】2) 成熟ラット単離肝細胞の採取法及び培養法

成熟ラット肝細胞初代培養は、Seglenらの方法に従い肝実質細胞を得た。7週齢、Sprague-Dawleyラット (体重150~200g) の腹腔中にネブタール10mg (50mg/ml を200 μ l) を注射し、麻酔をかけた。麻酔が効いたら、開腹し門脈にカテーテルをつないだチューブを通し、前灌流液を30ml/minの流速で流し、下大静脈を縛った後、上大静脈から同様にチューブを通し灌流液を循環し、2~3分間前灌流を行った。灌流が充分に行われてから、灌流液を37℃に保温した0.05%コラゲナーゼ灌流液に交換し、7~10分間コラゲナーゼ灌流を行った。灌流終了後、肝臓を摘出し、氷上で冷却しながら、冷細胞洗浄液 (ハックス溶液) 中にて、ナイフで

【0212】細胞懸濁液を $50 \times G$ で1分間遠心し、上清を注意深く吸引した後、底に固まっている細胞をウィリアムス (Williams) #E培地で同様に2回、 $50 \times G$ で1分間ずつ遠心を行った。この遠心操作で肝実質細胞を非実質細胞 (類洞内皮細胞、クッパー (Kupffer) 細胞、脂肪摂取細胞 (伊東細胞)) から分離することができた。

【0213】分離した肝実質細胞は細胞数、生存率

(0.6%トリパンブルーを用いた色素排除試験による) を算定後、小出らの変法にもとづくEnalのHDM培地 (10 μ g インシュリン、0.1 μ M CuSO₄ · 5H₂O、3nM H₂SeO₃、50pM ZnSO₄ · 7H₂O、50ng/ml EGF (上皮細胞増殖因子、宝酒造 (株)) ; 50 μ g/ml リノール酸、100U/ml ペニシリン、100U/ml ストレプトマイシン及び1 μ g/ml 殺菌剤を含むウィリアムス#E培地) に 3×10^5 cells/ml の濃度になるように希釈し、PPEADP結合グリコサミノグリカンをコートした60mmプライマリアディッシュ (Falcon 3802) に4mlづつ播種し、5%CO₂、95%空気、37℃、100%湿度下で培養した。培地は6時間目、1日目、3日目にそれぞれ半量ずつ新しい培地と交換した。

【0214】(結果) 10 μ g/ml の濃度で、CS (S3) - PPEADP (ロット602-2) (以下、「CS-PPEADP」と略す) をコートしたディッシュで集塊化の促進が顕著にみられた。1日目には10 μ g/ml の濃度で多層島状の半集塊状形態が観察された。2日目になると10 μ g/ml では、ほとんど集塊化し培地中を浮遊していた。一方、集塊化はCS (S3) やPPEADPのみをそれぞれコートした場合ではみられず、また、CS-PPEADPの濃度を100 μ g/mlに上げてても効果の増加はみられなかった。コントロールのディッシュ (未処理) では集塊化に至るまでにさらに2~3日かかり、その場合でも完全に浮遊した球状集塊の割合は少なかった。

【0215】各種PPEADP結合グリコサミノグリカンをを用いて行った上記試験によって集塊化の度合を観察した結果を表5に示す。

【0216】

【表5】

表5

ロット番号	集塊化の度合
602-2 (10 μ g/ml)	+++
604	+
606	+
600	+
601	+
コントロール (プライマリアのみ)	+

(+++、非常に良好； ++、良好； +、コントロール程度； -、障害)

【0217】また、フィブロネクチンを予め塗布した培養皿に表5の化合物を塗布した培養皿を使用し、新生ハムスター腎細胞 (BHK21細胞) の上記培養皿への接着を表5の化合物が阻害する接着阻害効果を調べた。

【0218】各種PPEADP結合グリコサミノグリカンの接着阻害効果を表す濃度曲線は図2のとおりであり、CS-PPEADP、DS-PPEADP、HS-PPEADP、HA-PPEADP、CH-PPEADPの順に阻害活性が高く、これより算出したIC₅₀を表6に示す。

【0219】

【表6】

表6

ロット番号	接着阻害におけるIC ₅₀ 値
602-2	0.77 μ g/ml
604	1.49
606	4.9
600	17.2
601	80.8

【0220】以上の結果から、本発明の各種球状集塊剤による肝細胞の球状集塊化能とフィブロネクチン基質に対する接着阻止能とは相関することが示唆された。

【0221】実施例2 CS-PPEADP、陽性荷電プラスチック製培養容器及びコラーゲンを培養基質として形成される球状集塊について肝特異的機能維持と、増殖に対する影響を検討した。

【0222】1) 成熟ラット肝細胞初代培養

実施例1と同様に肝細胞を単離後、 3×10^5 細胞/mlの濃度に調整し、各3点ずつ35mmプライマリアディッシュに1.5mlずつ播種した。

【0223】2) 培養基質のコート

10 μ g/mlのCS-PPEADPを含有するハンクス溶液1mlを35mmプライマリアディッシュ (Falcon 380

1; ベクトン・ディッキンソン社販売) に、また、0.03%のコラーゲン (セルマトリックスIC、(株)高研製) を含有する0.02N酢酸1mlを35mmプライマリアディッシュ (Falcon 3001; ベクトン・ディッキンソン社販売) に、それぞれ4℃で1夜かけてコートし、使用時にウイリアムス培地で2回洗浄後、細胞を播種した。

【0224】3) 増殖能の測定—³H-チミジンを用いた複製DNA合成活性の測定

一定条件下培養した細胞をラベル1日前に新しい培地と交換し、24時間後に1 μ Ciの³H-チミジンを加え、37℃で24時間培養を続けた。³H-チミジン添加24時間後、培地を除去し、氷冷燐酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞を洗浄後、1mlの冷10%トリクロル酢酸 (TCA) を加え、細胞を固定した。1時間冷蔵庫に放置後、TCAを吸引除去し、1mlの1N NaOHを加え、37℃で1時間インキュベートして肝細胞を完全に溶解した。細胞溶解液のうち100 μ l をとりDNA定量用に残し、残りを小試験管に移し、これに0.3mlの100% TCAを加え、10分間氷冷後、10,000rpmで20分間遠心した。上清を除去後、沈澱に0.5mlの10% TCAを加え、沸騰水浴上で15分間煮沸した。冷却後、10,000rpmで20分間遠心し、上清0.3mlをシンチレーションバイアルに取り、3mlのシンチレーターを加え、混合後、トリチウム (³H) の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

【0225】4) 肝特異的機能の指標としてのアルブミン分泌量の測定

アルブミン分泌量の測定は、酵素免疫法 (EIA法) により、ポリスチレンビーズを用いたサンドイッチ法で測定した。

【0226】抗ラットアルブミン抗体IgG分画 (Cappel社製) を、0.1M トリス塩酸緩衝液/0.15M NaCl溶液で10 μ g/mlに希釈した。これにポリスチレンビーズ (1/4" ϕ , PIERCE) を4個/mlになるように加え、室温下でゆっくり攪拌しながら脱気操作を2時間行った。脱気後、4℃で1夜放置した。ビーズをPB

Sで3回洗浄後、5.0mMリン酸緩衝液(pH7.4)/0.15M NaCl/0.1%ゼラチン/0.02%アジ化ナトリウム溶液に移し、この抗ラットアルブミン抗体結合ビーズは4℃で保存した(2~3ヶ月保存可)。

【0227】試料(24時間、一定条件下で肝細胞を培養した培養上清1.5mlのうち5μlを3点取って、上記リン酸緩衝液で希釈して用いた)あるいは標準ラットアルブミン溶液100μlに、500μlの上記リン酸緩衝液を加え、それに抗ラットアルブミン抗体結合ビーズを1個加え、室温で4時間攪拌しながらインキュベートした。次にビーズを5分間、3回、PBS/0.05%ツイーン20溶液で洗浄後、0.1%ゼラチンを含むPBS/0.05%ツイーン20溶液で1×10⁴倍に希釈した抗ラットアルブミン抗体IgG-パーオキシダーゼ標識体(Cappel社製)500μlを加え、4℃でゆっくり攪拌しながら1夜インキュベートした。ビーズを5分間、3回、PBS/0.05%ツイーン20溶液で洗浄後、5分間、1回、PBSで洗浄し、1mlの発色試薬(50mgのオーフェニレンジアミンと10μlの30% H_2O_2 を100mlの0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に溶解)を加え、室温下30分間ゆっくり攪拌しながら、インキュベートした。30分後、1.3N硫酸を1ml加え、反応を停止させた。発色を波長492nmの吸光度によって測定した。

【0228】5) DNA定量

80μlの各試料(1N NaOH溶液)を酢酸で中和後、エタノールで沈澱させ、この沈澱を100μlの1N NH₄OH溶液に溶解後、減圧下乾燥した。乾燥試料

に100μlのDABA試薬(0.4g ジアミノ安息香酸(DABA)・2HCl/1ml蒸留水、暗褐色に着色しているときは10~20mgのノーリットAで脱色後使用)を加え、よく攪拌後、パラフィルムで密封し、60℃の温浴中で30分間加熱した。冷却後、2mlの0.6N HClO₄を加え、よく攪拌後、10,000rpmで5分間遠心し、蛍光光度計を用い励起波長415nm、測定波長515nmで上清の吸光度を測定した。

【0229】(結果)CS-PPEADPをコートしたディッシュでは、培養後1日目で細胞の凝集が始まり、2日目には大部分が浮遊した球状集塊を形成した。1日目の凝集は細胞が単にくっつき合ったような形態で表面に凹凸があったが、2日目以降には集塊内の組織化が進み、平滑な表面になった。プライマリアでは、集塊形成はCS-PPEADPの場合よりも半日から1日遅い程度であった。それでも、多層島状の半集塊から徐々に浮遊しはじめ、ディッシュの大半から浮遊するにはさらに1日近く遅れた。コラーゲンをコートしたディッシュでは、培養後6時間ごろから接着し伸展し始め、1日目にはきれいな単層を形成した。培養を続けて行くと細胞は増え続け、細胞密度が増加したが、4日目を過ぎると細胞層が収縮を初め、5日目にはディッシュの辺縁部からきれいにはがれてしまい、小さな浮遊した膜のようなものを形成した。

【0230】このときの³H-チミジンの取り込みを表7に示す。

【0231】

【表7】

表7

日	CS-PPEADP	プライマリア	コラーゲン
1	9037± 943dpm	11543± 1444dpm	13178± 1054dpm
2	161106± 8966	224253± 39158	424915± 25774
3	190661± 11062	233336± 18039	564520± 37481
4	91490± 10449	80030± 6075	319286± 184
5	41456± 2268	46194± 5832	28958± 519

【0232】CS-PPEADP、プライマリア、コラーゲンの順に増殖が抑えられているのが判る。コラーゲンの5日目では³H-チミジンの取り込みが大きく減少しているのは、単層の細胞層が収縮し、三次元的構造を取り、細胞密度が高くなったためであろう。

【0233】肝特異的機能の指標としてのアルブミン分泌量の測定は、設定した条件下で、20~1,000ng/mlの濃度のラットアルブミン量が定量的に測定可能であった。この測定法を用いて、各培養条件下のDNA当たり24時間に分泌されるアルブミン量を測定した結果を図3に示す。CS-PPEADPを基質として用いた場

合、培養早期に球状集塊を形成し、プライマリアを基質として用いた場合よりも有意に肝機能維持の亢進の傾向がみられた。表7の³H-チミジンの取り込み、細胞形態の観察の結果を考え合わせると、早期の球状集塊形成が主な原因であると思われる。またコラーゲンを基質として用いた場合は、培養早期に機能維持の低下が進んだ。

【0234】以上のように、本発明の球状集塊化剤を用いた場合、球状集塊形成によって、良好な肝特異的機能維持が可能であることが示唆された。

【図面の簡単な説明】

【図1】肝実質細胞の集合の3形態を示す。

胞の接着率を示すグラフ。

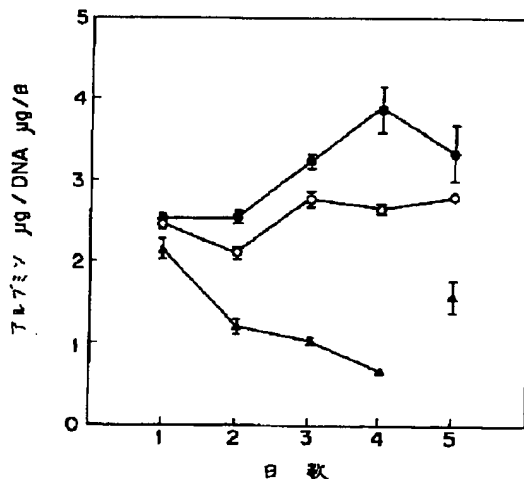
【図2】フィブロネクチンおよび各種磷脂質結合グリコ
サミノグリカンをコートした培養皿へのBHK-21細

【図3】CS-PPEADP等をコートして得た肝細胞
球状集塊化物のアルブミン産生分泌能を示すグラフ。

【図1】

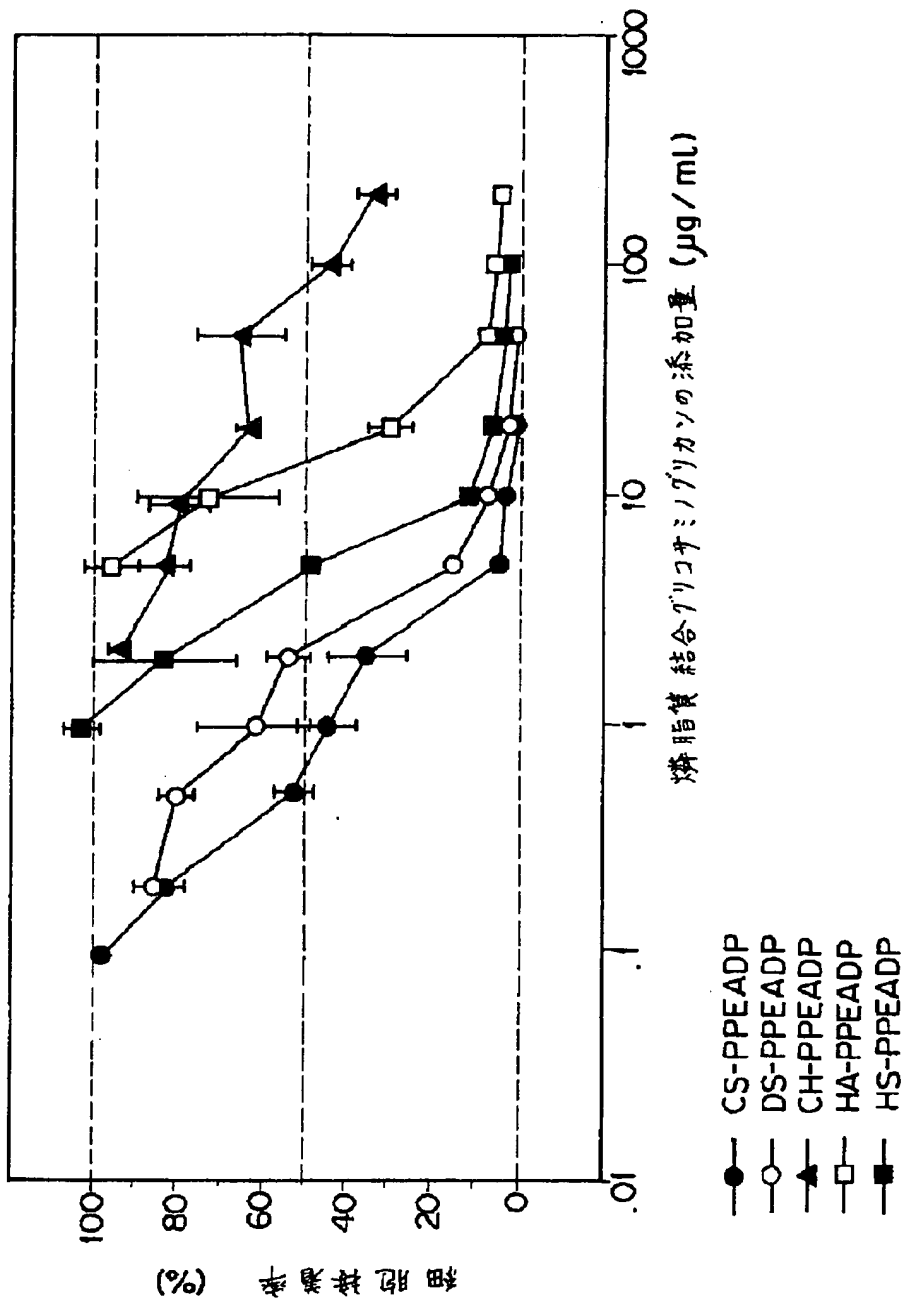


【図3】



● CS-PPEADP
○ プライマリア
▲ コラーゲン

【図 2】



【手続補正書】

【提出日】平成 4 年 1 1 月 2 7 日

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】肝細胞球状集塊化剤及び培養法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】脂質が共有結合したグリコサミノグリカンを含む肝細胞球状集塊化剤。

【請求項 2】該グリコサミノグリカンが、還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンである請求項 1 の肝細胞球状集塊化剤。

【請求項3】 脂質が共有結合したグリコサミノグリカンが、還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンのカルボキシル基（ラクトンを含む）、ホルミル基もしくは1級アミノ基、または導入されたスペーサーの前記基で脂質と結合している請求項2の肝細胞球状集塊化剤。

【請求項4】 脂質が共有結合したグリコサミノグリカンが、脂質の1級アミノ基、カルボキシル基もしくはホルミル基、または導入されたスペーサーの前記基で還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンと結合している請求項2の肝細胞球状集塊化剤。

【請求項5】 脂質とグリコサミノグリカンとの共有結合が、

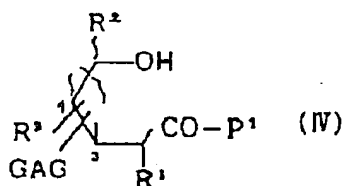
① 還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンのカルボキシル（ラクトンを含む）基と、脂質の1級アミノ基とから形成されたCONH結合、

② グリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシル基と、脂質の1級アミノ基とから形成されたCONH結合、または

③ 還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンのホルミル基と、脂質の1級アミノ基とから形成されたCH₂NH結合である請求項1の肝細胞球状集塊化剤。

【請求項6】 脂質が共有結合したグリコサミノグリカンが、一般式

【化1】



【上記式中、P¹は1級アミノ基を有する脂質を示し、GAGは開裂された還元末端部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、

(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリン、又はヘパラン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹はOH基を示し、R¹はCOOH基を示し、R¹はOH基を示す。

(2) GAGがコンドロイチン硫酸Dから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはヘパリン又はヘパラン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹はOSO₃H基を示し、R¹はCOOH基を示し、R¹はOH基を示す。

(3) GAGがコンドロイチン硫酸Kから還元性末端の

グルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹はOH基を示し、R¹はCOOH基を示し、R¹はOSO₃H基を示す。

(4) GAGがコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹およびR¹の少なくとも一つはOSO₃H基を示し、他はOH基を示し、R¹はCOOH基を示す。

(5) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R¹及びR¹はOH基を示し、R¹はCH₂OH基を示す。

(6) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R¹及びR¹はOH基を示し、R¹はCH₂OSO₃H基を示す。

(7) GAGがヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R¹はCH₂OH基を示し、R¹はOH基を示す。

(8) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R¹はCH₂OSO₃H基を示し、R¹はOSO₃H基を示す。

(9) GAGがコンドロイチン硫酸C又はDから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R¹はCH₂SO₃H基を示し、R¹はOH基を示す。

(10) GAGがコンドロイチン硫酸Eから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R¹はCH₂OSO₃H基を示し、R¹はOSO₃H基を示す。

(11) GAGがコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R¹は4位に置換し、R¹はNHCOCH₃基を示し、R¹はCH₂OH基でR¹はOSO₃H基を示すか、又はR¹はCH₂OSO₃H基でR¹はOH基もしくはOSO₃H基を示す。

(12) GAGがヘパリンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R¹は3位に置換し、R¹はNH₂SO₃H基を示し、R¹はCH₂OSO₃H基を示し、R¹はOH基を示す。

(13) GAGがヘパラン硫酸から還元性末端のヘキソ

サミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はNHCOCH₃、基又はNH₂SO₃H基を示し、R'はCH₃、OH基でR'はOSO₃H基を示すか、又はR'はCH₃、OSO₃H基でR'はOH基もしくはOSO₃H基を示す。

〔14〕GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'は、NHCOCH₃、基を示し、R'はCH₃、OSO₃H基を示し、R'はOH基を示す。〕で示される請求項1の肝細胞球状集塊化剤。

〔請求項7〕脂質がホスファチジルエタノールアミンであり、グリコサミノグリカンが還元末端が開裂されたコンドロイチン硫酸Cである請求項1の肝細胞球状集塊化剤。

〔請求項8〕脂質が共有結合したグリコサミノグリカンが、グリコサミノグリカンを酸化することによって還元末端を開裂させ、次いで該開裂還元末端部分にラク톤を形成させた後、脂質の1級アミノ基と反応させることによって得ることができるものである請求項1の肝細胞球状集塊化剤。

〔請求項9〕脂質結合グリコサミノグリカンを培養基質として肝実質細胞を培養することを特徴とする球状集塊化肝細胞の培養法。

〔請求項10〕請求項6の脂質結合グリコサミノグリカンを培養基質とする請求項9の培養法。

〔請求項11〕請求項7のホスファチジルエタノールアミンが結合したコンドロイチン硫酸Cを培養基質とする請求項9の培養法。

〔発明の詳細な説明〕

〔0001〕

〔産業上の利用分野〕本発明は、人工肝機能補助として機能する肝実質細胞の集塊の形成に関与する、脂質が共有結合したグリコサミノグリカンよりなる肝細胞球状集塊化剤、及び該集塊化剤を培養基質とする容器で肝細胞を培養する球状集塊化肝細胞の培養法に関する。

〔0002〕

〔従来の技術〕肝臓は、動物の代謝を司る重要な臓器であり、その機能は肝臓の約70%を示す肝実質細胞が担っている。また、その機能は肝実質細胞のみで発揮されるのではなく、非実質細胞や細胞外マトリックスとの相互作用と、それらに基づく組織の構築によって発揮される。つまり、生体では肝実質細胞が互いに接着し合った凝集集塊が形成されることによって生物活性を有する。

〔0003〕本発明者らは、先に肝細胞の機能を保持した肝実質細胞の集塊化培養法について研究し、高度な肝機能を維持し得る肝実質細胞の組織形態の再形成に係る物質を明らかにし、更に該物質の存在下に肝実質細胞を培養することにより長期間に亘り高度な機能を発現維持

し得る細胞集塊を形成し、ある程度の組織構築を再現することを可能にした。

〔0004〕すなわち、成熟ラットの肝臓からコラゲナーゼ門脈還流法により取得した分離肝実質細胞を、培養皿上に肝レチクリン線維由来のプロテオグリカンを塗布固相化した培養皿に接種し、EGF（上皮細胞増殖因子）、インシュリン等のホルモン添加無血清培地（HDM）で静置培養すると、図1に示すように、接種された肝細胞は初め単層として基質に接着しているが、以後時間の経過するに従い、互いに重なりあった多層島状となり、さらに収縮して球状の細胞集塊を形成し、培養皿表面から離れ、培養液中に浮遊する球状集塊となることを見出した〔Cell Struct. Funct., 13, 179 (1988); Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 385 (1989)〕。

〔0005〕上記レチクリン由来のプロテオグリカンは、グリカン部分の構成がデルマタン硫酸、ヘパラン硫酸及び未知の糖からなることが判明したが、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、あるいはラット肝臓から抽出したコラーゲンやフィブロネクチンのような接着性基質又は糖蛋白を固相化した基質では、肝細胞は培養皿に接着伸展し、単層のままであり、集塊化は起らなかった。

〔0006〕また陽性荷電プラスチック製、例えばポリスチレン製ディッシュの培養皿で肝細胞を培養すると、プロテオグリカンを塗布した培養皿で培養した場合と同様に浮遊した集塊となる。これはプラスチック皿上に接種された細胞がプロテオグリカンを分泌し、これが皿に吸着されるためと考えられている。〔Exp. cell Res. 186, 227 (1990)〕〔特開平1-277486号公報〕。

〔0007〕上記プロテオグリカンを培養基質として形成された肝細胞は肝細胞が球状に集塊化したものであり、浮遊しており、比較的長期間培養してもその形態が保持されている。また、肝細胞の単層培養物と比べてアルブミンの産生分泌能が高く、長期間一定のレベルを維持していることから、肝細胞集塊化物は高度な肝特異的分化機能を維持しており、また細胞集塊化物は、H⁺—チミジンの取り込み及び核ラベリングインデックスで測定する限り、細胞増殖活性は殆んどない特性を示すことから、生体に極めて近い組織構築の可能性を示した〔J. Clin. Electron Microscopy 21, 5 (1988)〕。

〔0008〕

〔発明が解決しようとする課題〕しかしながら、上記レチクリン線維由来のプロテオグリカンの収量は多くなく、調製も容易ではない。そこでプロテオグリカンに代り、肝細胞の球状集塊化物を効率的に形成し、肝細胞の分化機能の発現維持に効力を示す培養基質の開発が求められている。また、生体外で生体内と同様な機能を保持したまま肝細胞を長期間培養することは、生物学的人工肝機能補助装置の開発のためにも必要である。

〔0009〕

【課題を解決するための手段】本発明は、脂質が共有結合したグリコサミノグリカンを含む肝細胞球状集塊化剤を提供するものである。本発明の該集塊化剤は、レチクリン線維由来のプロテオグリカンをはるかに超越する球状集塊形成効果と肝細胞の分化機能の発現維持を示す。

【0010】本発明の肝細胞球状集塊化剤は、グリコサミノグリカン（以下、「GAG」と略すこともある）と脂質が共有結合によって結合した脂質結合GAGを含むものであればよい。特に脂質結合GAGは、GAGのカルボキシル基（ラクトンを含む）、ホルミル基、水酸基または1級アミノ基と、脂質の1級アミノ基、カルボキシル基またはホルミル基との間で形成されるCONH結合、エステル結合またはCH₂NH結合によって共有結合したものが好ましい。とりわけ、以下の①～③の結合によって結合したものが好ましい。

【0011】①還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンのカルボキシル（ラクトンを含む）基と、脂質の

1級アミノ基とから形成されたCONH結合、

②グリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシル基と、脂質の1級アミノ基とから形成されたCONH結合、または

③還元末端が開裂されたグリコサミノグリカンのホルミル基と、脂質の1級アミノ基とから形成されたCH₂NH結合。

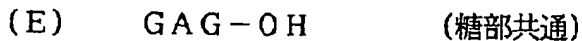
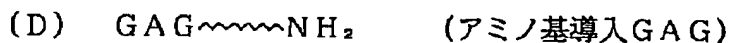
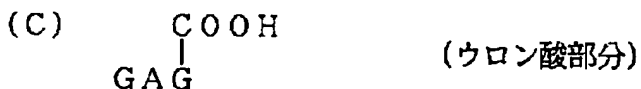
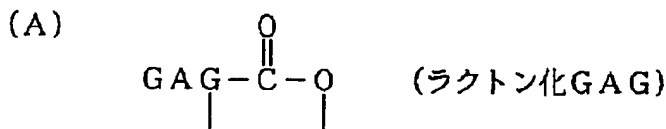
【0012】上記結合に関与する1級アミノ基、カルボキシル基、ホルミル基、水酸基は、GAGまたは脂質に元来存在するもの、これらに化学的処理を施すことによって形成されたもの、あるいは上記官能基を末端に具備するスペーサー化合物をあらかじめこれらと反応させることによって導入されたもののいずれであってもよい。

【0013】脂質結合GAGとその原料化合物との関係を模式的に示すと以下のとおりである。

【0014】

【化2】

(1) GAGまたはその誘導体



上式中、GAGはグリコサミノグリカン、 NH_2 は導入されたアミノ基を示す。

【0015】

【化3】

(2) 脂質またはその誘導体

- (イ) 脂質-NH₂ (アミノ基を有する燐脂質)
- (ロ) 脂質~~~~NH₂ (アミノ基を導入した脂質)
- (ハ) 脂質~~~~COOH (カルボキシル基を導入した脂質)
- (ニ)
- $$\text{脂質}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{H} \quad (\text{アルデヒド化脂質})$$

上式中、~~~~COOHは導入されたカルボキシル基を示す。

【0016】

【化4】

(3) 脂質結合GAG

- (a) (A) + (イ) → GAG-CONH-脂質
- (b) (A) + (ロ) → GAG-CONH~~~~脂質
- (c) (B) + (イ) → GAG-CH₂NH-脂質
- (d) (B) + (ロ) → GAG-CH₂NH~~~~脂質
- (e) (C) + (イ) → CONH-脂質
|
GAG
- (f) (C) + (ロ) → CONH~~~~脂質
|
GAG
- (g) (D) + (ハ) → GAG~~~~HNCO~~~~脂質
- (h) (D) + (ニ) → GAG~~~~HNCH₂-脂質
- (i) (E) + (ハ) → GAG-O-CO-脂質

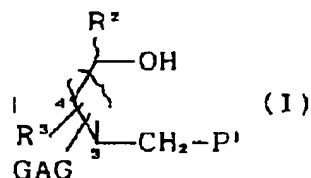
【0017】本発明で用いる脂質結合グリコサミノグリカンは、その塩であることができ、好ましくはナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属塩；カルシウム、マグネシウムのようなアルカリ土類金属塩；トリアルキルアミンのようなアミン塩；ピリジンのような有機塩基との塩であることができる。

【0018】本発明で用いる脂質結合グリコサミノグリカンは、次のものを包含する。

【0019】1. 一般式

【0020】

【化5】



【0021】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0022】上記式中、P¹ は1級アミノ基を有する脂質を示し、GAGはグリコサミノグリカン残基であって、

【0023】(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタ

ン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はCOOH基を示し、R'はOH基を示す。

【0024】(2) GAGがコンドロイチン硫酸K又はコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はCOOH基を示し、R'はOSO₃H基を示す。

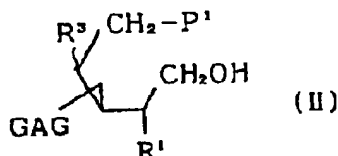
【0025】(3) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はCH₂OH基を示し、R'はOH基を示す。

【0026】(4) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はCH₂OSO₃H基を示し、R'はOH基を示す。

【0027】2. 一般式

【0028】

【化6】



【0029】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0030】上記式中、P'は1級アミノ基を有する脂質を示し、GAGはグリコサミノグリカン残基であって、

【0031】(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチンから還元性末端のヘキサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R'はNHCOCH₃基を示し、R'はOH基を示す。

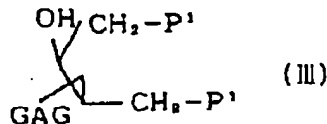
【0032】(2) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキサミン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R'はNHCOCH₃基を示し、R'はOH基を示す。

【0033】(3) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R'及びR'はOH基を示す。

【0034】3. 一般式

【0035】

【化7】



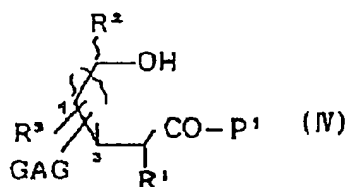
【0036】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0037】上記式中、P'は1級アミノ基を有する脂質を示し、GAGはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示す。

【0038】4. 一般式

【0039】

【化8】



【0040】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0041】上記式中、P'は1級アミノ基を有する脂質を示し、GAGはグリコサミノグリカン残基であって、

【0042】(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリン、又はヘパラン硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はOH基を示し、R'はCOOH基を示し、R'はOH基を示す。

【0043】(2) GAGがコンドロイチン硫酸Dから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはヘパリン又はヘパラン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はOSO₃H基を示し、R'はCOOH基を示し、R'はOH基を示す。

【0044】(3) GAGがコンドロイチン硫酸Kから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はOH基を示し、R'はCOOH基を示し、R'はOSO₃H基を示す。

【0045】(4) GAGがコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'およびR'の少なくとも一つはOSO₃H基を示し、他はOH基を示し、R'はCOOH基を示す。

【0046】(5) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残

基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'及びR'はOH基を示し、R'はCH₂OH基を示す。

【0047】(6) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'及びR'はOH基を示し、R'はCH₂OSO₃H基を示す。

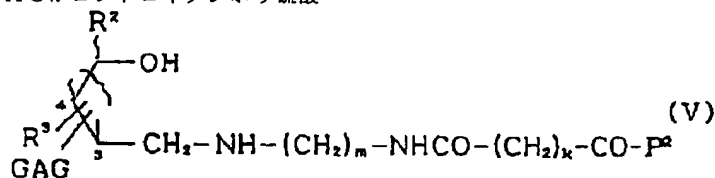
【0048】(7) GAGがヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はNHCOCH₃基を示し、R'はCH₂OH基を示し、R'はOH基を示す。

【0049】(8) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はNHCOCH₃基を示し、R'はCH₂OH基を示し、R'はOSO₃H基を示す。

【0050】(9) GAGがコンドロイチン硫酸C又はDから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はNHCOCH₃基を示し、R'はCH₂OSO₃H基を示し、R'はOH基を示す。

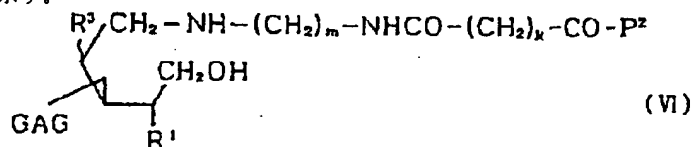
【0051】(10) GAGがコンドロイチン硫酸Eから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はNHCOCH₃基を示し、R'はCH₂OSO₃H基を示し、R'はOSO₃H基を示す。

【0052】(11) GAGがコンドロイチンポリ硫酸



【0058】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0059】上記式中、P¹は脂質を示し、GAG、R'及びR'は式(I)に記載と同じである。mは1~8を示し、kは1~10を示す。



【0062】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0063】上記式中、GAG、R'及びR'は式(I)に記載と同じであり、m、k及びP¹は式(V)に記載と同じである。

から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R'は4位に置換し、R'はNHCOCH₃基を示し、R'はCH₂OH基でR'はOSO₃H基を示すか、又はR'はCH₂OSO₃H基でR'はOH基もしくはOSO₃H基を示す。

【0053】(12) GAGがヘパリンから還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はNH₂SO₃H基を示し、R'はCH₂OSO₃H基を示し、R'はOH基を示す。

【0054】(13) GAGがヘパラン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はNHCOCH₃基又はNH₂SO₃H基を示し、R'はCH₂OH基でR'はOSO₃H基を示すか、又はR'はCH₂OSO₃H基でR'はOH基もしくはOSO₃H基を示す。

【0055】(14) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R'は3位に置換し、R'はNHCOCH₃基を示し、R'はCH₂OSO₃H基を示し、R'はOH基を示す。

【0056】5. 一般式

【0057】

【化9】

【0060】6. 一般式

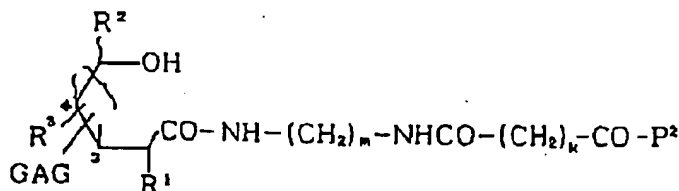
【0061】

【化10】

【0064】7. 一般式

【0065】

【化11】



(VII)

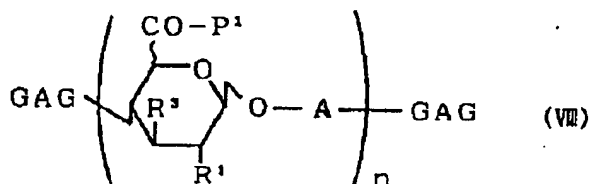
【0066】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

【0067】上記式中、GAG、 R^1 、 R^2 及び R^3 は式 (IV) に記載と同じであり、 m 、 k 及び P^2 は式 (V) に記載と同じである。

【0068】8. 一般式

【0069】

【化12】



【0070】を有する脂質結合グリコサミノグリカン。

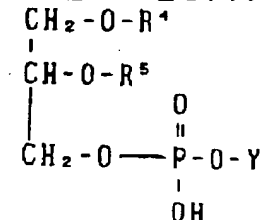
【0071】上記式中、 P^1 は1級アミノ基を有する脂質を、GAGはグリコサミノグリカン残基を示し、 n はグリコサミノグリカンに存在するカルボキシ基の数以下を示し、AはGAGの種類によって特定されるヘキサミンまたはその硫酸エステルを示し、

【0072】(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、又はデルマトン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 及び R^3 はOH基を示す。

【0073】(2) GAGがコンドロイチン硫酸Dのグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 はOSO₃H基を示し、 R^3 はOH基を示す。

【0074】(3) GAGがコンドロイチン硫酸Kのグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 はOH基を示し、 R^3 はOSO₃H基を示す。

【0075】(4) GAGがコンドロイチンポリ硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 及び R^3 の少なくとも一つはOSO₃H基を示し、他はOH基を示す。



(IX)

【0082】(式中、 R^4 及び R^5 はそれぞれ水素、 -CH=CHR^4 又は -COR^4 (R^4 及び R^5 はC、 \sim 、のアルキル基)であり(ただし、 R^4 と R^5 が同時に水素である場合を除く)、Yは -CH_2 、 CH_2 、 NH 、又は

【0076】(5) GAGがヘパリン又はヘパリン硫酸のグリコサミノグリカン鎖のとき、 R^1 はOH基又はOSO₃H基を示し、 R^3 はOH基を示す。

【0077】グリコサミノグリカンとしては、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸(コンドロイチン硫酸B)、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸が例示される。

【0078】グリコサミノグリカンの分子量は好ましくは1,000~100万のものが用いられる。

【0079】上記式(V)、(VI)又は(VII)で表わされる脂質結合GAGを製造する際に原料として使用する1級アミノ基を導入したGAGは、後述の方法によってGAGの還元末端を開裂させて得られるラクトン化GAGまたはアルデヒド化GAGと $\text{NH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_m\text{-NH}_2$ 、 -NH_2 で表わされるアルキレンジアミンを反応させることによって製造することができる。このような1級アミノ基を導入したGAGは、上記アルキレンジアミンの代りにリジンなどの2個のアミノ基を有するアミノ酸を反応させることによっても得ることができる。また、アルキレンジアミン、アミノ酸はGAGのウロン酸部分のカルボキシル基と反応させることもできる。

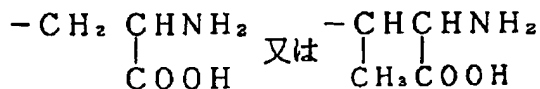
【0080】上記式(I)、(II)、(III)、(IV)及び(VIII)の P^1 で示される脂質残基の原料である1級アミノ基を有する脂質としては、下式(IX)で表わされるホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルトレオニン、プラスマローゲンなどの磷脂質が例示される。

【0081】

【化13】

【0083】

【化14】

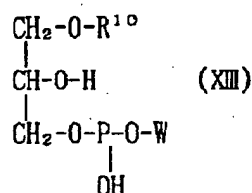
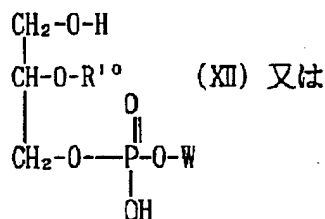
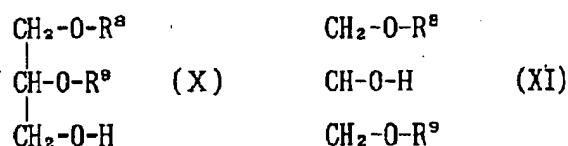


【0084】である)で示されるものが用いられる。特にR'及びR'がともにパルミトイル(ヘキサデカノイル)又はステアロイル(オクタデカノイル)のような-COR'であるか、R'が-CH=CHR'でR'が-COR'であるものが好ましい。

【0085】また、上記式(V)、(VI)及び(VII)のP'で示される脂質残基の原料である脂質としては、

【0086】

【化15】



【0087】(式中、R'及びR'はそれぞれ水素、アルキル基、-CH=CHR'又は-COR'(R'及びR

'は前記と同じ)であり(ただし、同時に水素である場合を除く)、R''はアルキル基、-CH=CHR'又は-COR'(R'及びR'は前記と同じ)であり、Wは-CH₃、CH₃、N'(CH₃)₂、又はイノシトール残基である)

【0088】で示されるものが用いられる。特にR'及びR'がともにパルミトイル(ヘキサデカノイル)又はステアロイル(オクタデカノイル)のような-COR'であるか、R'が水素で、R'が-COR'である式(X)又は(XI)の脂質、或いはR''が-COR'である式(XII)又は(XIII)の磷脂質が好ましい。

【0089】上記式(V)、(VI)又は(VII)で表わされる脂質結合GAGを製造する際に原料として使用するカルボキシル基を導入した脂質(HOOC-(CH₂)_n-CO-O-P')は、後述の水酸基を有する脂質とジカルボン酸(HOOC-(CH₂)_n-COOH)またはその反応性誘導体を反応させることによって製造することができる。

【0090】なお、前記(二)のアルデヒド化脂質は、例えばグリセルアルデヒドの水酸基をアシル化またはエーテル化することによって製造することができる。

【0091】以下に、本発明の磷脂質又は脂質結合グリコサミノグリカンの製造法について詳しく説明する。

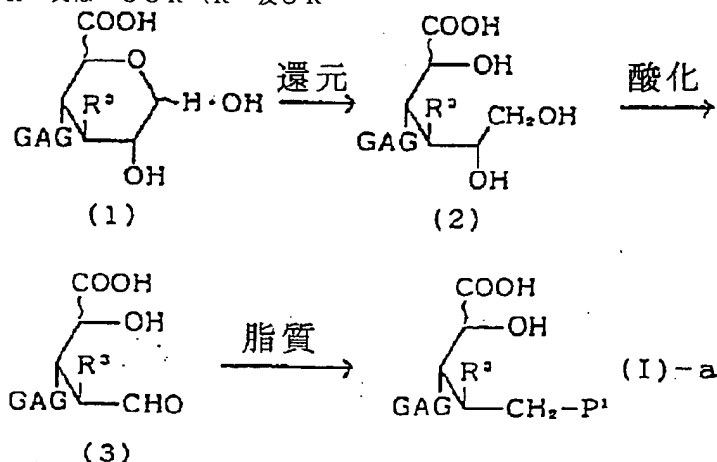
【0092】還元末端限定酸化法

この方法は、グリコサミノグリカンの還元性末端のウロン酸部分もしくはガラクトース部分又はヘキシサミン部分を還元及び部分酸化することにより開裂させてアルデヒド(ホルミル基)を形成させ、このアルデヒドと脂質の1級アミノ基との間の還元的アルキル化反応により、脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。この方法を反応式で示せば次のとおりである。

【0093】(A)還元性末端糖のグルクロン酸又はイズロン酸に反応する場合

【0094】

【化16】



【0095】(R'は前述と同じ、P'は1級アミノ基

を有する脂質を示す)

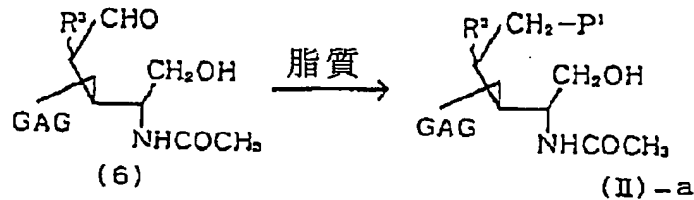
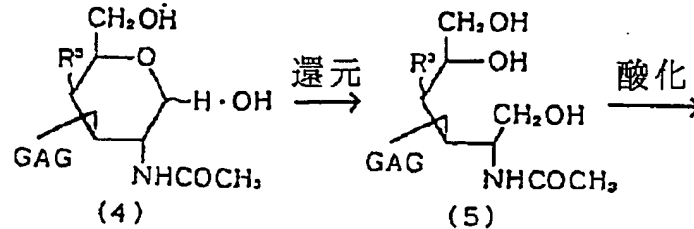
【0096】還元性末端がC-2にOHを有するD-グルクロン酸又はL-イズロン酸である式(1)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイトン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(1)-aの脂質結合グリコ

サミノグリカンが製造できる。

【0097】(B)還元性末端糖のグルコサミン又はガラクトサミンに反応する場合

【0098】

【化17】



【0099】(式中、R' は前述と同じ、P' は1級アミノ基を有する脂質を示す)

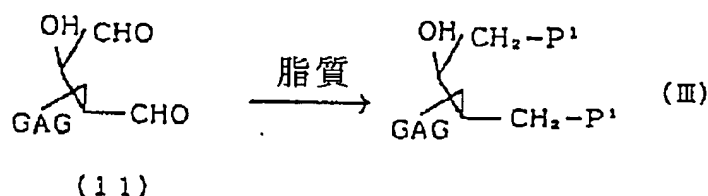
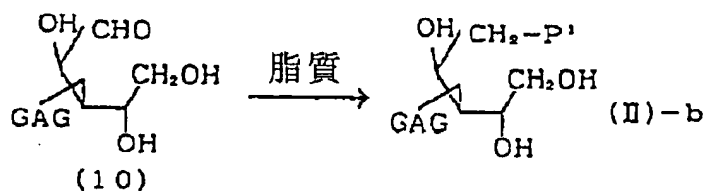
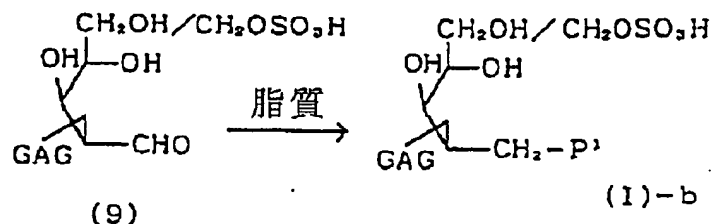
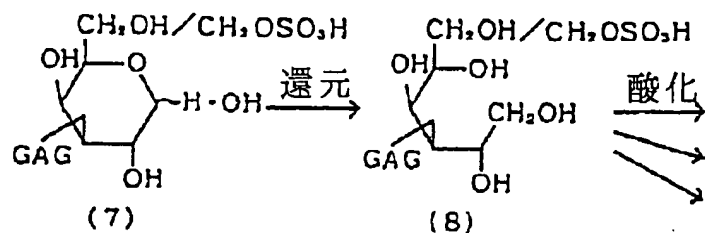
式に従い、式(II)-aの脂質結合グリコサミノグリカンが製造できる。

【0100】還元性末端のC-6に水酸基(OH)を有するグルコサミン又はガラクトサミンである式(4)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸を原料として使用したとき、上記反応

【0101】(C)還元性末端糖のガラクトースに反応する場合

【0102】

【化18】



【0103】（式中、P' は1級アミノ基を有する脂質を示す）

【0104】還元性末端糖がガラクトースである式（7）のケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式（I）-b、（II）-b及び（III）の脂質結合グリコサミノグリカンが製造できる。

【0105】上記（A）、（B）又は（C）の方法においては、先ず、上記式（1）、（4）又は（7）で示されるグルコサミノグリカン還元して還元性末端糖部分を開裂させて式（2）、（5）又は（8）の化合物とする。

【0106】この還元を使用する還元剤としては、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどの水素化ホウ素アルカリ塩等を用いることができる。

【0107】また、上記還元反応における溶媒は、水又は0.05M 酢酸塩緩衝液（pH8.3）等を用いることができる。

【0108】また還元反応温度は、通常10～30℃、好ましくは15～25℃で行うことができる。

【0109】還元剤の使用量は、その種類等によっても異なるが、一般には式（1）、（4）又は（7）の化合物1モルに対して5～50当量、好ましくは25～30当量の範囲である。

【0110】得られる式（2）、（5）又は（8）の化合物を次いで部分的に酸化すると、式（3）、（6）、（9）、（10）又は（11）のアルデヒド化合物が生成する。

【0111】この酸化反応に使用する酸化剤としては、過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウムなどの過ヨウ素酸アルカリ塩等を用いることができる。

【0112】酸化剤の使用量は、式(2)、(5)又は(8)の化合物1モルに対して1~10当量、好ましくは3~6当量の範囲である。

【0113】酸化反応温度は、0~10℃、好ましくは0~4℃の範囲で行うことができる。

【0114】生成した(3)、(6)、(9)、(10)又は(11)のアルデヒド化合物は、それ自体既知の還元的アルキル化法に従い、脂質の1級アミノ基と反応させることができ、これによって本発明の球状集塊剤として有効な一般式(I)、(II)又は(III)で示される脂質結合グリコサミノグリカンを得ることができる。

【0115】上記反応に用いることのできる脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルトレオニン、エタノールアミン、プラスマロゲン、セリン、プラスマロゲン等を挙げることができる。

【0116】上記還元的アルキル化反応は、水、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)又はジメチルホルムアミ

ドのような溶媒中において、式(3)、(6)、

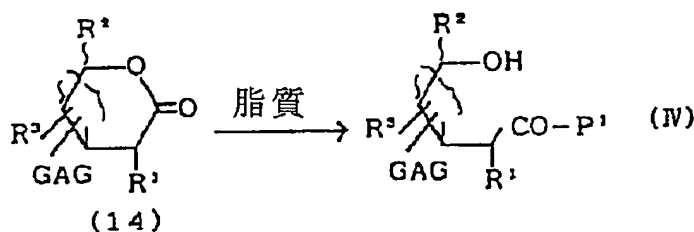
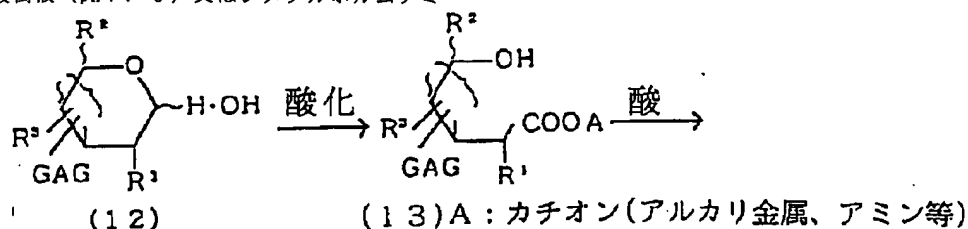
(9)、(10)又は(11)のアルデヒド化合物とクロロホルム等に溶解した脂質とを混合して均一な溶液にし、通常15~60℃の温度で反応させ、それと同時に又はその後に、例えばシアノ水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤を用いて還元することにより一般式(I)、(II)又は(III)の化合物を製造することができる。

【0117】還元末端ラクトン化法

この方法は、グリコサミノグリカンの還元性末端ウロン酸部分もしくはガラクトース部分又はヘキシサミン部分を酸化することにより該末端糖部分を開裂させ、更にラクトンを形成させて、このラクトンと脂質の1級アミノ基との反応により脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。この方法を反応式で示せば次のとおりである。

【0118】

【化19】



【0119】(式中、R¹、R²及びR³は前述と同じ、P¹は1級アミノ基を有する脂質を示す)

【0120】本方法において、先ず、式(12)で示されるグリコサミノグリカンに酸化して還元性末端部分を開裂させ、式(13)のカルボキシ化合物とする。

【0121】式(12)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸を原料として使用することができる。

【0122】この酸化に使用しうる酸化剤としては、ヨウ素、臭素等を用いることができる。

【0123】酸化剤の使用量は、式(12)の化合物1モルに対して2~20当量、好ましくは5~15当量の

範囲である。

【0124】酸化反応における溶媒は、水又は0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)等を用いることができる。

【0125】酸化反応温度は、0~40℃、好ましくは15~20℃で行うことができる。

【0126】生成する式(13)の化合物は、次いで酸で処理することにより式(14)のラクトン化合物にすることができる。

【0127】ここで用いることのできる酸としては、強酸性陽イオン交換樹脂、例えばダウエックス50(商品名;ダウ・ケミカル社製)、アンバーライトIR120(商品名;オルガノ(株)製)等を挙げることができる。

【0128】得られる式(14)のラクトン化合物は、次いで1級アミノ基を有する脂質と反応させることによ

り、前記一般式 (IV) の脂質結合グリコサミノグリカン
を製造することができる。

【0129】上記反応に用いることのできる脂質として
は、前記還元末端限定酸化法において例示したものを用
いることができる。

【0130】式 (14) のラクトン化合物と脂質との反
応は、水、0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) 又はジ
メチルホルムアミド等に溶解した式 (14) のラクトン
化合物と、クロロホルム等に溶解した脂質とを混合して
均一な溶液にし、5~80℃、好ましくは30~60℃
の温度で反応させることにより一般式 (IV) の化合物を
製造することができる。

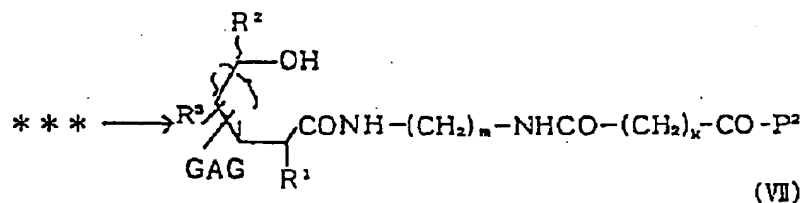
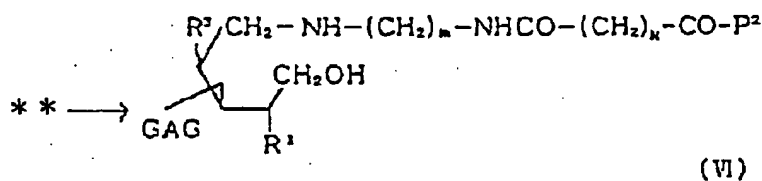
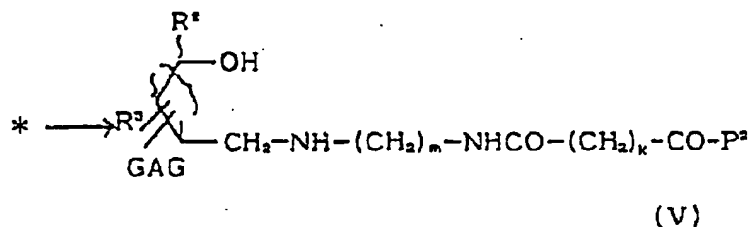
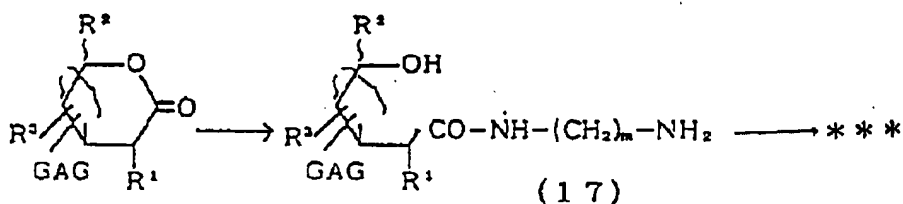
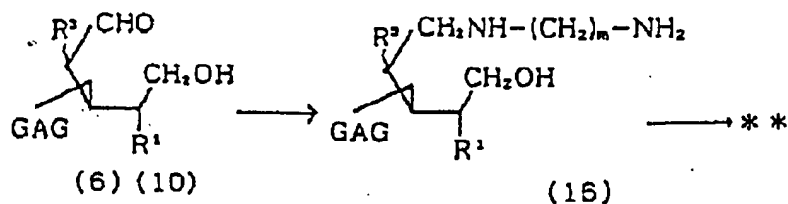
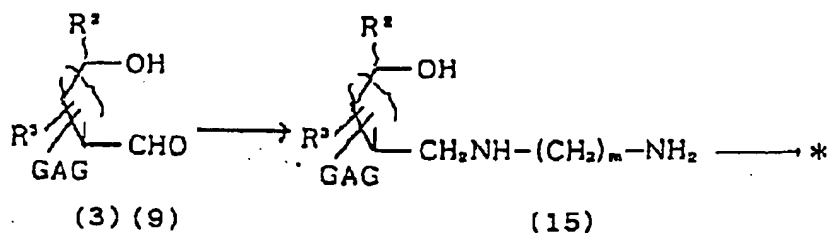
【0131】還元末端アミン法

この方法は、前記式 (3)、(6)、(9) もしくは
(10) のアルデヒド化合物又は (14) のラクトン化
合物にアルキレンジアミンを反応させ、末端に1級アミ
ノ基が導入されたグリコサミノグリカン誘導体とし、次
にこの1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体
とカルボキシル基が導入された脂質誘導体とを反応さ
せ、アミノ基とカルボキシル基との結合により、脂質結
合グリコサミノグリカンを製造する方法である。

【0132】この方法を反応式で示せば次のとおりであ
る。

【0133】

【化20】



【0134】（式中、 R^1 、 R^2 及び R^3 は前述と同じ、 P^2 は脂質を示す）

【0135】グリコサミノグリカン誘導体式（15）又は（16）は、式（3）、（6）、（9）又は（10）の化合物とアルキレンジアミンとを前記還元末端限定酸化法と同様に還元剤の存在下、還元的アルキル化法によって反応させることによって得られる。また、グリコサミノグリカン誘導体式（17）は、式（14）の化合物とアルキレンジアミンとを前記還元末端ラクトン化法に

おける脂質との反応と同様に反応させることによって得られる。

【0136】この反応に使用できるアルキレンジアミンとしては一般式

【0137】 $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_m - \text{NH}_2$

【0138】（式中、 m は 1～8 の整数）

【0139】で示される化合物を用いることができる。

【0140】還元剤としては、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等を用いることができる。

【0141】還元剤の使用量は、上記反応に使用するグルコサミノグリカンのモル数の10～100倍モル量である。

【0142】反応溶媒は、水又は0.05Mリン酸緩衝液等を用いることができる。

【0143】反応温度は、0～60℃、好ましくは4～25℃で行う。

【0144】また、カルボキシル基をもつ脂質誘導体は、グリセロール骨格に水酸基をもつ脂質とジカルボン酸又はその反応性誘導体（酸無水物、ハロゲン化物など）とを反応させて得られる。

【0145】この反応に使用できる脂質としては、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、リゾホスファチジルコリン又はリゾホスファチジイルノシトール、水酸基を有するエテル脂質もしくは燐脂質等を用いることができる。

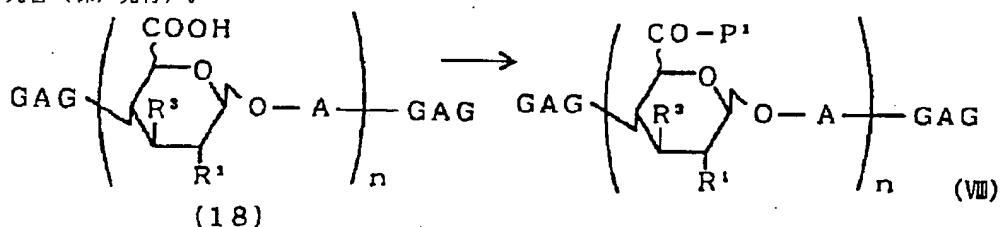
【0146】ジカルボン酸又はその反応性誘導体としては、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、フマル酸、マレイン酸、テレフタル酸又はその酸無水物、ハロゲン化物（塩化物など）を用いることができる。

【0147】縮合剤を使用する場合、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

【0148】反応溶媒としては、クロロホルム、アセトアニリド、ジメチルホルムアミド等を用いることができる。

【0149】反応温度は、縮合剤の存在下でジカルボン酸を使用するときは0～60℃を、また無水ジカルボン酸を使用するときは20～80℃で行うことができる。

【0150】還元末端に1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体とカルボキシル基をもつ脂質誘導体とを反応させる方法は、先ず該脂質誘導体をペプチド化学の分野でよく知られている方法に従って該脂質誘導体のカルボキシル基を活性化し、次いで該グリコサミノグリカン誘導体と反応させる方法で行うことができる（「ペプチド合成の基礎と実験」、泉屋信夫、脇道典ら著、昭和60年、丸善（株）発行）。



【0162】（式中、R¹、R²、A及びP¹は前述と同じ）

【0163】本方法で原料として用いることのできるグリコサミノグリカン（18）は、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コ

【0151】上記脂質誘導体のカルボキシル基を活性化する方法としては、上記脂質誘導体とN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシピペリジン、2,4,5-トリクロロフェニルノール等とを縮合剤の存在下で反応させ、該カルボキシル基を活性エステルに変える方法で行うことができる。

【0152】反応溶媒としては、クロロホルム、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド又は該溶媒の混合液を用いることができる。

【0153】縮合剤としては、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

【0154】反応温度は、0～60℃で行う。

【0155】上記方法によって得られたカルボキシル基が活性化された上記脂質誘導体と、1級アミノ基をもつグリコサミノグリカン誘導体（15）（16）又は（17）とを反応させれば、脂質結合グリコサミノグリカン（V）、（VI）又は（VII）を得ることができる。

【0156】上記反応溶媒としては、クロロホルム、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド又は該溶媒の混合液を用いることができる。

【0157】また、反応温度は、0～60℃で行う。

【0158】縮合剤使用法

ケラタン硫酸及びケラタンポリ硫酸以外のグリコサミノグリカンはD-グルクロン酸又はL-イズロン酸を含有し、これらのウロン酸はC-5にカルボキシル基を有する。

【0159】この方法は、ウロン酸のカルボキシル基と脂質の1級アミノ基とを縮合剤の存在下で反応させ、脂質結合グリコサミノグリカンを製造する方法である。

【0160】この方法を反応式で示せば次のとおりである。

【0161】

【化21】

ンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン又はヘパラン硫酸である。

【0164】脂質としては、前記還元末端限定酸化法において例示したものを用いることができる。

【0165】縮合剤としては、ジエチルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、メチルプロピルカ

ルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ヘキサメチレンカルボジイミド、ヘプタメチレンカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド・メソ-p-トルエンスルホネート、1-t-ブチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジフェニルカルボジイミド、4, 4'-ジニトロジフェニルカルボジイミド、ジ-p-トリルカルボジイミド又はビス(トリメチルシリル)カルボジイミド等を挙げることができる。

【0166】縮合剤の使用量は、脂質の使用モル量の10~100倍モル量を用いることができる。

【0167】溶媒としては、ジメチルホルムアミド、クロロホルム又は該溶媒の混合液等を用いることができる。

【0168】反応温度は、4~60℃、好ましくは15~25℃で行う。

【0169】グリコサミノグリカン活性化法

この方法は、上記縮合剤使用法と同様に、ウロン酸のカルボキシル基を、脂質の1級アミノ基と結合させることにより、脂質結合グリコサミノグリカン(VIII)を製造する方法であって、反応に際してカルボキシル基を活性化する方法である。

【0170】本方法で使用するこのできるグリコサミノグリカン及び脂質としては、上記縮合剤使用法と同様のものを用いることができる。

【0171】カルボキシ基を活性化する方法としては、ペプチド化学の分野でよく知られている方法に従って、グリコサミノグリカンのウロン酸部分のカルボキシ基を活性化することができる(「ペプチド合成の基礎と実験」前記)。

【0172】活性化する方法としては、例えばグリコサミノグリカンにN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシピペリジン、2, 4, 5-トリクロロフェノール等を縮合剤の存在下で反応させて、該カルボキシ基を活性エステルに変えることができる。

【0173】ウロン酸部分のカルボキシル基はそのアミン、有機塩基、アルカリ金属等との塩として反応させることもできる。

【0174】アミンとしては、トリ(n-ブチル)アミン、トリエチルアミン等を、有機塩基としてはピリジン等を、アルカリ金属としてはナトリウム、カリウム等を挙げることができる。

【0175】反応溶媒としては、ジメチルホルムアミド、ピリジン、ジメチルスルホキシド等を用いることができる。

【0176】縮合剤としては、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等を用いることができる。

【0177】反応温度は、0~60℃、好ましくは4~20℃で行う。

【0178】上記方法によって得られた、カルボキシル基が活性化されたグリコサミノグリカンを脂質と反応させれば、一般式(VIII)の脂質結合グリコサミノグリカンを得ることができる。

【0179】上記反応は、ジメチルホルムアミド、クロロホルム又は該溶媒の混合液の溶液において、上記活性化グリコサミノグリカンと脂質とを0~90℃、好ましくは25~60℃で反応させる。

【0180】また、本発明の一般式(I)~(VIII)で示される脂質結合グリコサミノグリカンの脂質の含有量は、0.005~50%、好ましくは2~10%の範囲である。

【0181】以上に述べた各種の方法で製造される脂質結合グリコサミノグリカンの分離、精製方法としては、反応液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱物をろ取することで未反応の脂質を除き、さらに該沈澱物を疎水クロマトに負荷し、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、塩化ナトリウム等の塩の水溶液で洗浄することで未反応のグリコサミノグリカンを除去する。この後、該疎水クロマトに吸着した脂質結合グリコサミノグリカンを10~50%メタノール水溶液で溶出する方法で行うことができる。

【0182】上記脂質が結合したグリコサミノグリカンの製造例は、特願平2-193816号明細書もまた参照される。

【0183】本発明の肝細胞球状集塊化剤として用いられる脂質結合グリコサミノグリカンの内、式(IV)で表わされる燐脂質結合グリコサミノグリカンが好適に用いられる。内でもホスファチジルエタノールアミンと還元末端が開裂されたコンドロイチン硫酸Cとが共有結合したものが最も好適に用いられる。

【0184】上記肝細胞球状集塊化剤を用いて肝実質細胞を培養するには、脂質結合グリコサミノグリカンを培養基質として、肝実質細胞を公知の方法で培養することにより、球状集塊化肝細胞が得られる。すなわち、具体的には培養容器の細胞との接触面に上記球状集塊化剤を塗布して培養する方法が採用できる。

【0185】培養容器としては、好ましくは前記公知の陽性荷電プラスチックディッシュ、例えばポリスチレン製ディッシュであるプライマリア3801または3802

(商標名、ベクトン・デッキンソン社)が用いられる(特開平1-296982号公報参照)。該容器の表面に脂質が結合したグリコサミノグリカンの溶液(10μg/ml~10mg/ml程度)を培養基質として塗布し、コートした後、単離肝細胞を播種し(1×10⁴~1×10⁶細胞/ml程度)、インシュリン、EGF等を含むホルモン添加無血清培地(ウイリアムス#E培地等)中で約37℃で培養する。培地は適宜新しい培地と交換して

6時間～数日間培養する。肝細胞は初め単層を形成するが、次第に多層島状の半集塊を形成し、更に集塊が進むと球状に凝集して集塊化し、培養皿から離れて培養液中に浮遊するようになる。このようにして形成した球状集塊の直径は50～150 μ m、好ましくは70～120 μ mであり、また細胞数は50～300個、好ましくは70～250個により形成される。球状集塊化肝細胞は、例えば培養液を50×G、1分間の遠心分離を行うことによって回収することができる。

【0186】脂質結合グリコサミノグリカンの存在下では、肝細胞が培養基質との接着が阻害され、集塊するものと考えられ、集塊化の活性は、脂質結合グリコサミノグリカンが、新生ハムスター腎細胞（BHK細胞）等のフィブロネクチン基質への接着を阻害する接着阻害率と相関がある。

【0187】上記接着阻害活性の大きい脂質結合グリコサミノグリカンほど低濃度で集塊を形成する。好ましくは細胞接着阻害活性が後記実施例に記載の方法で測定される50%阻害に必要な濃度（IC₅₀）として400 μ g/ml以下であるものが用いられる。一方グリコサミノグリカン自体を用いても集塊化せず、また陽性荷電プラスチックの培養容器などのみ又は従来のプロテオグリカンと比べて、脂質結合グリコサミノグリカンを培養基質とすることによって、はるかに短時間で集塊効果を示したことは全く意外であり、肝細胞の実用的培養が可能となった。

【0188】かくして得られる肝細胞の集塊化物は、アルブミンの産生分泌能が高く、肝特異的分化機能を維持していることが確認された。また集塊化物はH⁺—チミジンの取り込みがほとんどないことから細胞増殖は抑制されており、ガンのような増殖と区別された。

【0189】

【発明の効果】本発明により、肝特異的機能を維持し、長時間安定に集塊化し、浮遊した球状集塊化肝細胞を効率的に得ることができる。脂質が共有結合したグリコサミノグリカンは、プロテオグリカンと異なり、人工的に容易に製造できる細胞外マトリックスであるので、人工肝機能補助装置の開発の助けになるものである。

【0190】

【実施例】以下に本発明の実施例を示す。

【0191】 参考例

還元末端ラクトン化法による燐脂質結合グリコサミノグリカンの製造

【0192】（1）還元末端酸化グリコサミノグリカンの製造

1）還元末端酸化ヒアルロン酸の製造

500mgのヒアルロン酸（鶏冠由来、MW1万：HA1）を水10mlに溶解し、0.1Mヨウ素のメタノール溶液5mlを加えて室温で6時間反応させた。その後、反応液に0.1N水酸化カリウムを約5ml加えて遊離のヨウ素の色を消失させた。この溶液に酢酸カリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱をろ取し、充分にエタノールで洗浄し、減圧乾燥した。

【0193】これによりロット番号400の還元末端酸化ヒアルロン酸（カリウム塩）423mgを得た。

【0194】ソモジーネルソン法による還元糖の有無：無

【0195】2）還元末端ラクトンヒアルロン酸の製造
400mgのロット番号400の還元末端酸化ヒアルロン酸を水10mlに溶解し、強酸性イオン交換樹脂（Dowex 50（H⁺））50mlに1時間を要して通過させ、還元末端ラクトンヒアルロン酸390mgを含む水溶液を得た。

【0196】ソモジーネルソン法による還元糖の有無：無

【0197】上記の水溶液をトリ—n—ブチルアミンで中和し、凍結乾燥して還元末端ラクトンヒアルロン酸のトリ—n—ブチルアミン塩（ロット番号500）400mgを得た。

【0198】3）他の還元末端ラクトングリコサミノグリカンの製造方法

コンドロイチン（MW1.5万：CH）、コンドロイチン硫酸C（MW1万：CS（S1）、MW3万：CS（S3）及びMW6万：CS（S6））、デルマタン硫酸（MW1.5万：DS）、ヘパリン（MW1.5万：HeP）、及びヘパラン硫酸（MW1.5万：HS）

【0199】を原料として、上記1）に準じて表1の条件で還元末端酸化グリコサミノグリカンを製造した。ひきつづき、上記2）に準じて表2の条件で還元末端ラクトングリコサミノグリカンを製造した。

【0200】

【表1】

表1

ロット番号	生成物	反応条件 GAG/0.1M-1 ₂ /0.1N-KOH (mg/ml/ml)	収量 (mg)	ソモジー ネルソン
401	CH-COOK	1000/13.4/13.4	823	—
402	CS(S1)-COOK	1000/19.8/19.8	901	—
402-2	CS(S3)-COOK	1000/ 3.3/ 3.3	895	—
402-3	CS(S6)-COOK	1000/4.95/4.95	913	—
404	DS-COOK	100/0.67/0.67	91	—
405	Hep-COOK	1000/ 6.7/ 6.7	902	—
406	HS-COOK	100/1.34/1.34	88	—

ソモジーネルソン；ソモジーネルソン法による還元糖の有無（有は+、無は-で示す）

【0201】

【表2】

表2

ロット番号	生成物	反応条件 GAG-COOK/Dowex50(H ⁺) (mg/ml)	収量 (mg)	ソモジー ネルソン
501	CH-ラクトン	800/400	780	—
502	CS(S1)-ラクトン	900/450	805	—
502-2	CS(S3)-ラクトン	800/400	850	—
502-3	CS(S6)-ラクトン	900/450	887	—
504	DS-ラクトン	90/100	96	—
505	Hep-ラクトン	900/400	946	—
506	HS-ラクトン	80/40	72	—

ソモジーネルソン；ソモジーネルソン法による還元糖の有無（有は+、無は-で示す）

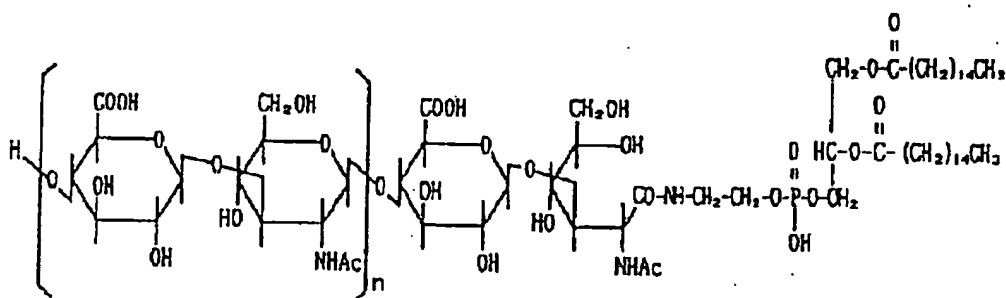
【0202】(2) L- (α-ホスファチジル) エタノールアミン・ジバルミトイル (PPEADP) 結合グリコサミノグリカンの製造

1) L- (α-ホスファチジル) エタノールアミン・ジ

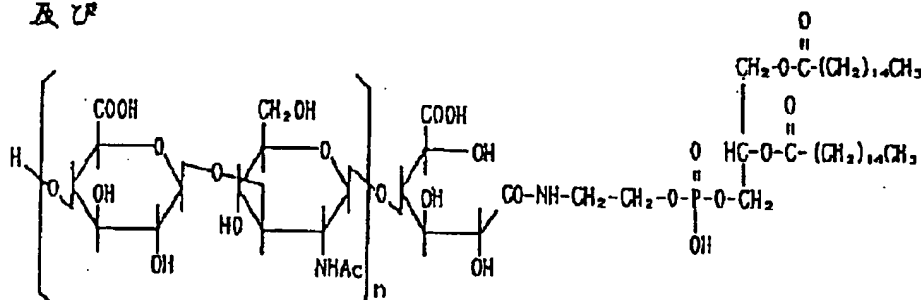
バルミトイル結合ヒアルロン酸の製造

【0203】

【化22】



及び



n : 平均 2.5

【0204】400mgのロット番号500の還元末端ラクトンヒアルロン酸を200mlのジメチルホルムアミドに溶解し、27.6mgのPPEADPのクロロホルム溶液を加えて、70℃で2時間反応させ、クロロホルムを溜去し、過剰の酢酸ナトリウム水溶液を加えてナトリウム塩にしてから、酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えた。生じた沈澱をろ取り、0.3M酢酸アンモニウム溶液に溶解し、疎水クロマトカラム(TSKgel フェニルトヨパール650M (東ソー(株)製)400ml)に吸着し、十分に0.3M塩化アンモニウム水溶液で洗浄し、30%メタノール水溶液で溶出した。素通り及び洗浄画分に未反応ヒアルロン酸が溶出され、30%メタノール水溶液による溶出画分に目的とする本品が溶出した。30%メタノール水溶液溶出画分を減圧下濃縮し、透析で脱塩後、凍結乾燥して精製し、ロット番号600

の目的物36mgを得た。

【0205】リン含量: 0.30%

PPEADP含量: 6.44%

ヒアルロン酸含量: 82.37%

【0206】2) その他のL- (α-ホスファチル) エタノールアミン・ジバロミトイル結合グリコサミノグリカンの製造

表2に示した還元末端ラクトングリコサミノグリカンとPPEADPとを表3に示した条件で、上記(1) - 2)の方法に準じて反応させ、表3のPPEADP結合グリコサミノグリカンを製造した。得られた生成物の分析値を表4に示した。

【0207】

【表3】

表3

ロット番号	生成物	反応条件 (mg/mg) GAG-ラクトン/PPEADP
601	CH-PPEADP	700/32.3
602	CS(S1)-PPEADP	800/55.4
602-2	CS(S3)-PPEADP	400/9.26
602-3	CS(S6)-PPEADP	800/9.00
604	DS-PPEADP	90/4.15
605	Hep-PPEADP	800/36.91
606	HS-PPEADP	70/3.31

【0208】

【表4】

表4

ロット番号	収量 (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
601	70.2	4.30	90.90
602	88.0	6.41	85.17
602-2	20	2.01	89.70
602-3	56.2	1.08	92.00
604	4.5	4.00	90.66
605	24	4.11	90.01
606	5.74	4.22	88.21

【0209】実施例1

1) 培養容器(ディッシュ)への磷脂質結合グリコサミノグリカンの塗布(コート)

各種濃度(1~100 µg/ml)の下記表5の磷脂質結合グリコサミノグリカンをハックス(Hanks')溶液(Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 196(1949))に溶解後、2mlづつポリスチレン製ディッシュ(Primaria3802、ベクトン・ディッキンソン社販売、60mm)に加え、4℃で1晩かけてコートした。

【0210】コート後、ディッシュをハックス溶液で2回洗浄した。ホルモン添加無血清培地(HDM)に単離肝細胞を 3×10^5 細胞/mlの濃度で懸濁し、4mlづつ播種した。以下、常法にしたがって培養を行い、1日目、2日目に顕微鏡観察、写真撮影を行った。

【0211】2) 成熟ラット単離肝細胞の採取法及び培養法

成熟ラット肝細胞初代培養は、Seglenらの方法(Methods in Cell Biology, Vol. XIII, pp.29~83(1976), Academic Press)に従い肝実質細胞を得た。7週齢、Sprague-Dawleyラット(体重150~200g)の腹腔中にネンブタール(商標名、アボット・ラボラトリーズ社)10mg(50mg/mlを200 µl)を注射し、麻酔をかけた。麻酔が効いたら、開腹し門脈にカテーテルをつないだチューブを通し、前灌流液を30ml/minの流速で流し、下大静脈を縛った後、上大静脈から同様にチューブを通し灌流液を循環し、2~3分間前灌流を行った。灌流が充分に行われてから、灌流液を37℃に保温した0.05%コラゲナーゼ灌流液に交換し、7~10分間コラゲナーゼ灌流を行った。灌流終了後、肝臓を摘出し、氷上で冷却しながら、冷細胞洗浄液(ハックス溶液)中にて、ナイフでほぐすように細切し、細胞を回収

した。

【0212】細胞懸濁液を50×Gで1分間遠心し、上清を注意深く吸引した後、底に固まっている細胞をウィリアムス(Williams) #E培地で同様に2回、50×Gで1分間ずつ遠心を行った。この遠心操作で肝実質細胞を非実質細胞(類洞内皮細胞、クッパー(Kupffer)細胞、脂肪摂取細胞(伊東細胞))から分離することができた。

【0213】分離した肝実質細胞は細胞数、生存率(0.6%トリパンブルーを用いた色素排除試験による)を算定後、小出らの変法(Cell Struct. Funct., 1, 179~188(1988))にもとづくEnatのHDM培地(10 µg インシュリン、0.1 µM CuSO₄ · 5H₂O、3nM H₂SeO₄、50pM ZnSO₄ · 7H₂O、50ng/ml EGF(上皮細胞増殖因子、宝酒造(株))；50 µg/mlリノール酸、100U/mlペニシリンG；100U/mlストレプトマイシン及び1 µg/ml殺菌剤を含むウィリアムス#E培地)に 3×10^5 cells/mlの濃度になるように希釈し、PPEADP結合グリコサミノグリカンをコートした60mmポリスチレン製ディッシュ(Primaria3802、60mm)に4mlづつ播種し、5%CO₂、95%空気、37℃、100%湿度下で培養した。培地は6時間目、1日目、3日目にそれぞれ半量ずつ新しい培地と交換した。

【0214】(結果)10 µg/mlの濃度で、CS(S3)-PPEADP(ロット602-2)(以下、「CS-PPEADP」と略す)をコートしたディッシュで集塊化の促進が顕著にみられた。1日目には10 µg/mlの濃度で多層島状の半集塊状形態が観察された。2日目になると10 µg/mlでは、ほとんど集塊化し培地中を浮遊していた。一方、集塊化はCS(S3)やPPEADPのみをそれぞれコートした場合ではみられず、また、CS-PPEADPの濃度を100 µg/mlに上げても効果の増加はみられなかった。コントロールの陽性荷電プラスチックディッシュ(未処理)では集塊化に至るまでにさらに2~3日かかり、その場合でも完全に浮遊した球状集塊の割合は少なかった。

【0215】各種PPEADP結合グリコサミノグリカンを用いて行った上記試験によって集塊化の度合を観察した結果を表5に示す。

【0216】

【表5】

表5

ロット番号	集塊化の度合
602-2 (10 μ g/ml)	+++
604	+
606	+
600	+
601	+
コントロール (未処理ディシュ)	+

(+++、非常に良好； ++、良好； +、コントロール程度； -、阻害)

【0217】また、フィブロネクチンを予め塗布した培養皿に表5の化合物を塗布した培養皿を使用し、新生ハムスター腎細胞 (BHK 21細胞) の上記培養皿への接着を表5の化合物が阻害する接着阻害効果を調べた。

【0218】各種PPEADP結合グリコサミノグリカンの接着阻害効果を表す濃度曲線は図2のとおりであり、CS-PPEADP、DS-PPEADP、HS-PPEADP、HA-PPEADP、CH-PPEADPの順に阻害活性が高く、これより算出したIC₅₀を表6に示す。

【0219】

【表6】

表6

ロット番号	接着阻害におけるIC ₅₀ 値
602-2	0.77 μ g/ml
604	1.49
606	4.9
600	17.2
601	80.8

【0220】以上の結果から、本発明の各種球状集塊剤による肝細胞の球状集塊化能とフィブロネクチン基質に対する接着阻止能とは相関することが示唆された。

【0221】実施例2

CS-PPEADP、陽性荷電プラスチック製培養容器及びコラーゲンを培養基質として形成される球状集塊について肝特異的機能維持と、増殖に対する影響を検討した。

【0222】1) 成熟ラット肝細胞初代培養

実施例1と同様に肝細胞を単離後、3 \times 10⁵細胞/mlの濃度に調整して細胞懸濁液を得た。

【0223】2) 培養基質のコート

10 μ g/mlのCS-PPEADPを含有するハックス溶

液1mlを35mmポリスチレン製陽性荷電プラスチックディシュ (Primaria 3801; ペクトン・ディッキンソン社販売) に、また、0.03%のコラーゲン (セルマトリックスIC、(株)高研製) を含有する0.02N酢酸1mlを35mmポリスチレン製ディシュ (Falcon 3001; ペクトン・ディッキンソン社販売) に、それぞれ4℃で1夜かけてコートし、使用時にウイリアムス培地で2回洗浄後、細胞を播種した。

【0224】3) 増殖能の測定 - ³H-チミジンを用いた複製DNA合成活性の測定

上記(1)で単離した肝細胞懸濁液を上記(2)で調製したCS-PPEADP処理ディシュ、陽性荷電プラスチックディシュ又はコラーゲン処理ディシュに1.5mlずつ播種し、実施例1と同様に培養した。培養した細胞をラベル1日前に新しい培地と交換し、24時間後に1 μ Ciの³H-チミジンを加え、37℃で24時間培養を続けた。³H-チミジン添加24時間後、培地を除去し、氷冷磷酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞を洗浄後、1mlの冷10%トリクロル酢酸 (TCA) を加え、細胞を固定した。1時間冷蔵庫に放置後、TCAを吸引除去し、1mlの1N NaOHを加え、37℃で1時間インキュベートして肝細胞を完全に溶解した。細胞溶解液のうち100 μ lをとりDNA定量用に残し、残りを小試験管に移し、これに0.3mlの100% TCAを加え、10分間氷冷後、10,000rpmで20分間遠心した。上清を除去後、沈澱に0.5mlの10% TCAを加え、沸騰水浴上で15分間煮沸した。冷却後、10,000rpmで20分間遠心し、上清0.3mlをシンチレーションバイアルに取り、3mlのシンチレーターを加え、混合後、トリチウム (³H) の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

【0225】4) 肝特異的機能の指標としてのアルブミン分泌量の測定

アルブミン分泌量の測定は、酵素免疫法 (EIA法) により、ポリスチレンビーズを用いたサンドイッチ法で測定した。

【0226】抗ラットアルブミン抗体 IgG 分画 (Capp

el社製)を、0.1M トリス塩酸緩衝液/0.15M NaCl溶液で10 μ g/mlに希釈した。これにポリスチレンビーズ(1/4" ϕ , PIERCE)を4個/mlになるように加え、室温下でゆっくり攪拌しながら脱気操作を2時間行った。脱気後、4℃で1夜放置した。ビーズをPBSで3回洗浄後、50mMリン酸緩衝液(pH7.4)/0.15M NaCl/0.1%ゼラチン/0.02%アジ化ナトリウム溶液に移し、この抗ラットアルブミン抗体結合ビーズは4℃で保存した(2~3ヶ月保存可)。

【0227】試料(24時間、一定条件下で肝細胞を培養した培養上清1.5mlのうち5 μ lを3点取って、上記リン酸緩衝液で希釈して用いた)あるいは標準ラットアルブミン溶液100 μ lに、500 μ lの上記リン酸緩衝液を加え、それに抗ラットアルブミン抗体結合ビーズを1個加え、室温で4時間攪拌しながらインキュベートした。次にビーズを5分間、3回、PBS/0.05%ツイーン20溶液で洗浄後、0.1%ゼラチンを含むPBS/0.05%ツイーン20溶液で1 \times 10⁴倍に希釈した抗ラットアルブミン抗体IgG-パーオキシダーゼ標識体(Cappel社製)500 μ lを加え、4℃でゆっくり攪拌しながら1夜インキュベートした。ビーズを5分間、3回、PBS/0.05%ツイーン20溶液で洗浄後、5分間、1回、PBSで洗浄し、1mlの発色試薬(50mgのオ-フェニレンジアミンと10 μ lの30%H₂O₂を100mlの0.1M トリス塩酸緩衝液(pH7.4)に溶解)を加え、室温下30分間ゆっくり攪拌しながら、インキュベートした。30分後、1.3N 硫酸を1ml加え、反応を停止させた。発色を波長492nmの吸光度によって測定した。

【0228】5) DNA定量

80 μ lの各試料(1N NaOH溶液)を酢酸で中和後、エタノールで沈澱させ、この沈澱を100 μ lの1

N NH₄OH溶液に溶解後、減圧下乾燥した。乾燥試料に100 μ lのDABA試薬(0.4g ジアミノ安息香酸(DABA)・2HCl/1ml蒸留水、暗褐色に着色しているときは10~20mgのノーリットA(商標名、ナカライ・テスク社;活性炭)で脱色後使用)を加え、よく攪拌後、パラフィルムで密封し、60℃の温浴中で30分間加熱した。冷却後、2mlの0.6N HClO₄を加え、よく攪拌後、10,000rpmで5分間遠心し、蛍光光度計を用い励起波長415nm、測定波長515nmで上清の吸光度を測定した。

【0229】(結果)CS-PPEADPをコートしたディッシュでは、培養後1日目で細胞の凝集が始まり、2日目には大部分が浮遊した球状集塊を形成した。1日目の凝集は細胞が単にくっつき合ったような形態で表面に凹凸があったが、2日目以降には集塊内の組織化が進み、平滑な表面になった。陽性荷電プラスチックディッシュでは、集塊形成はCS-PPEADP処理ディッシュの場合よりも半日から1日遅い程度であった。それでも、多層島状の半集塊から徐々に浮遊しはじめ、ディッシュの大半から浮遊するにはさらに1日近く遅れた。コラーゲンをコートしたディッシュでは、培養後6時間ごろから接着し伸展し始め、1日目にはきれいな単層を形成した。培養を続けて行くと細胞は増え続け、細胞密度が増加したが、4日目を過ぎると細胞層が収縮を初め、5日目にはディッシュの辺縁部からきれいにはがれてしまい、小さな浮遊した膜のようなものを形成した。

【0230】このときの³H-チミジンの取り込みを表7に示す。

【0231】

【表7】

表7

日	CS-PPEADP	陽 性 荷 電 プラスチック	コラーゲン
1	9037 \pm 943dpm	11543 \pm 1444dpm	13178 \pm 1054dpm
2	161106 \pm 8966	224253 \pm 39158	424915 \pm 25774
3	190661 \pm 11062	233336 \pm 18039	564520 \pm 37481
4	91490 \pm 10449	80030 \pm 6075	319286 \pm 184
5	41456 \pm 2268	46194 \pm 5832	28958 \pm 519

【0232】CS-PPEADP処理ディッシュ、陽性荷電プラスチックディッシュ(未処理)、コラーゲン処理ディッシュの順に増殖が抑えられているのが判る。コラーゲン処理ディッシュの5日目では³H-チミジンの取り込みが大きく減少しているのは、単層の細胞層が収縮し、三次元的構造を取り、細胞密度が高くなったためであろう。

【0233】肝特異的機能の指標としてのアルブミン分泌量の測定は、設定した条件下で、20~1,000ng/mlの濃度のラットアルブミン量が定量的に測定可能であった。この測定法を用いて、各培養条件下のDNA当たり24時間に分泌されるアルブミン量を測定した結果を図3に示す。CS-PPEADPを基質として用いた場合、培養早期に球状集塊を形成し、未処理の陽性荷電プ

ラスチックディッシュを基質として用いた場合よりも有意に肝機能維持の亢進の傾向がみられた。表 7 の'H-チミジンの取り込み、細胞形態の観察の結果を考え合わせると、早期の球状集塊形成が主な原因であると思われる。またコラーゲンを基質として用いた場合は、培養早期に機能維持の低下が進んだ。

【0234】以上のように、本発明の球状集塊化剤を用いた場合、球状集塊形成によって、良好な肝特異的機能維持が可能であることが示唆された。

【図面の簡単な説明】

【図1】肝実質細胞の集合の3形態を示す。

【図2】フィブロネクチンおよび各種磷脂質結合グリコサミノグリカンをコートした培養皿へのBHK-21細胞の接着率を示すグラフ。

【図3】CS-PPEADP等をコートして得た肝細胞球状集塊化物のアルブミン産生分泌能を示すグラフ。

【手続補正2】

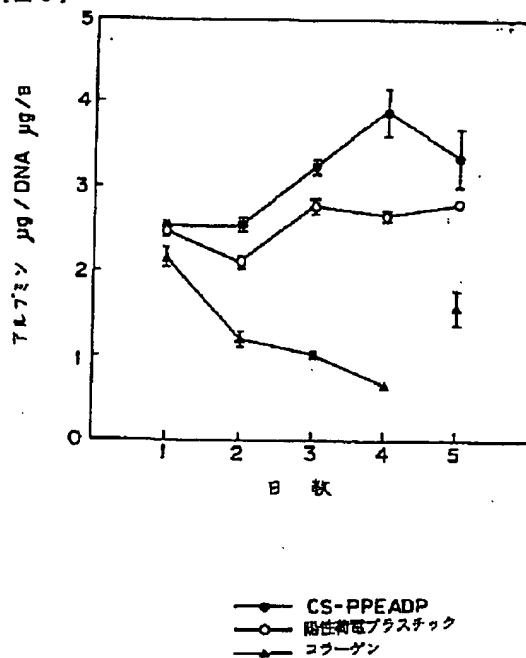
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成5年4月7日

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】

